

**PRODUKSI DAN PROFIL KOMPONEN SENYAWA BIOAKTIF
ORGANOSULFUR PADA KULTUR SUSPENSI SEL
BAWANG PUTIH (*Allium sativum* L.) TUNGGAL SEBAGAI RESPON
TERHADAP PEMBERIAN PREKURSOR DAN ELISITOR**

DISERTASI

oleh

FRIDA KUNTI SETIOWATI

177090100111002

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



**PROGRAM DOKTOR BIOLOGI
JURUSAN BIOLOGI**

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2021

**PRODUKSI DAN PROFIL KOMPONEN SENYAWA BIOAKTIF ORGANOSULFUR
PADA KULTUR SUSPENSII SEL BAWANG PUTIH (*Allium sativum* L.) TUNGGAL
SEBAGAI RESPON TERHADAP PEMBERIAN PREKURSUS DAN ELISITOR**

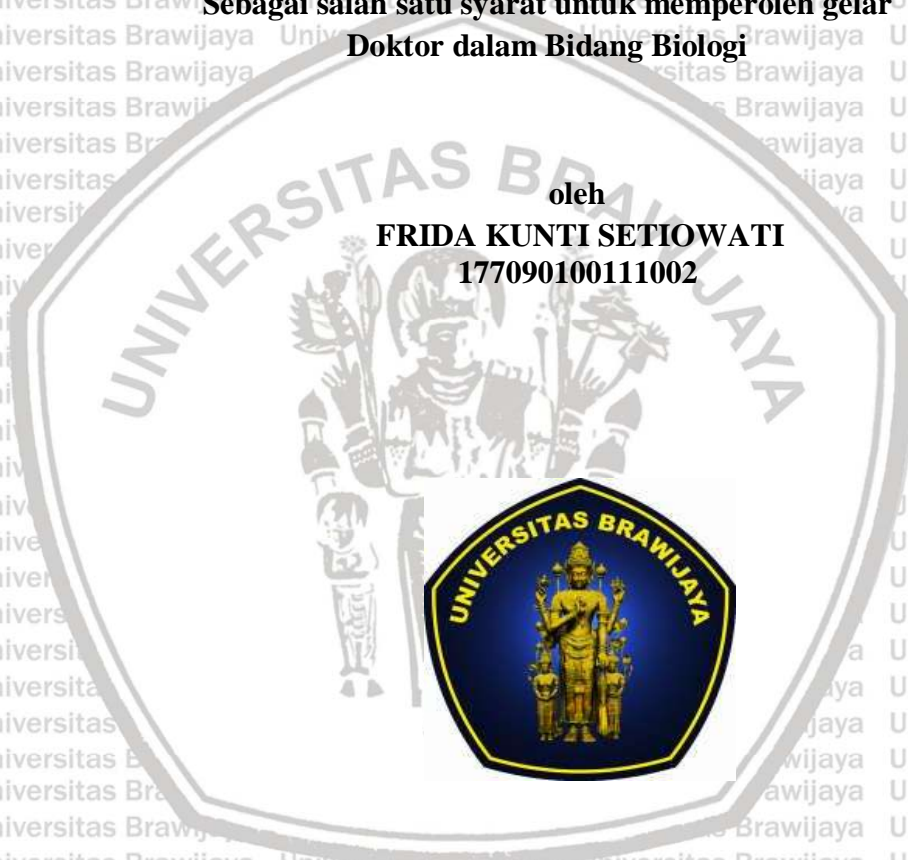
DISERTASI

**Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Doktor dalam Bidang Biologi**

oleh

FRIDA KUNTI SETIOWATI

177090100111002



PROGRAM DOKTOR BIOLOGI

JURUSAN BIOLOGI

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2021

**PRODUKSI DAN PROFIL KOMPONEN SENYAWA BIOAKTIF ORGANOSULFUR
PADA KULTUR SUSPENSII SEL BAWANG PUTIH (*Allium sativum* L.) TUNGGAL
SEBAGAI RESPON TERHADAP PEMBERIAN PREKURSOR DAN ELISITOR**

FRIDA KUNTI SETIOWATI

177090100111002

Telah dipertahankan di depan Majelis Penguji

Pada tanggal 13 Juli 2021 dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh

Gelar Doktor dalam Bidang Biologi

KOMISI PEMBIMBING

PROMOTOR

Dr. Wahyu Widoretno, M.Si
NIP. 196304141989032001

KO-PROMOTOR I

Dr. Sasangka Prasetyawan, M.S.
NIP. 196304041987011001

KO-PROMOTOR II

Dr. Betty Lukiaty, M.S.
NIP. 195702271982032002

MENGETAHUI,

KETUA JURUSAN BIOLOGI



Prof. Muhaimin Rifa'i, S.Si, Ph.D.Med.Sc
NIP. 196806261997021001

**KETUA PROGRAM STUDI DOKTOR
BIOLOGI**



Tri Ardyati, M.Agr., Ph.D
NIP. 196712131991032001

SUSUNAN KOMISI PEMBIMBING DAN PENGUJI DISERTASI

Judul Disertasi:

**PRODUKSI DAN PROFIL KOMPONEN SENYAWA BIOAKTIF ORGANOSULFUR
PADA KULTUR SUSPENSII SEL BAWANG PUTIH (*Allium sativum* L.) TUNGGAL
SEBAGAI RESPON TERHADAP PEMBERIAN PREKURSOR DAN ELISITOR**

Nama : Frida Kunti Setiowati

NIM : 177090100111002

KOMISI PROMOTOR

Promotor : Dr. Wahyu Widoretno, M.Si

Ko Promotor I : Dr. Sasangka Prasetyawan. M.S.

Ko Promotor II : Dr. Betty Lukiat, M.S.

TIM DOSEN PENGUJI

Dosen Penguji I : Ir. Retno Mastuti, M.Agr.Sc., D.Agr.Sc.

Dosen Penguji II : Prof. Dr. Agr. H. Mohammad Amin

Dosen Penguji III : Dr. Dra. Serafinah Indriyani, M.Si

Tanggal Ujian Tertutup : 13 Juli 2021

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS DISERTASI

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya, di dalam Naskah Disertasi ini tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu Perguruan Tinggi, dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila ternyata di dalam Naskah Disertasi ini dapat dibuktikan terdapat unsur-unsur plagiasi, saya bersedia Disertasi ini digugurkan dan gelar akademik yang telah saya peroleh (DOKTOR) dibatalkan, serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku.

Malang, Juli 2021



Nama : Frida Kunti Setiowati

NIM : 177090100111002

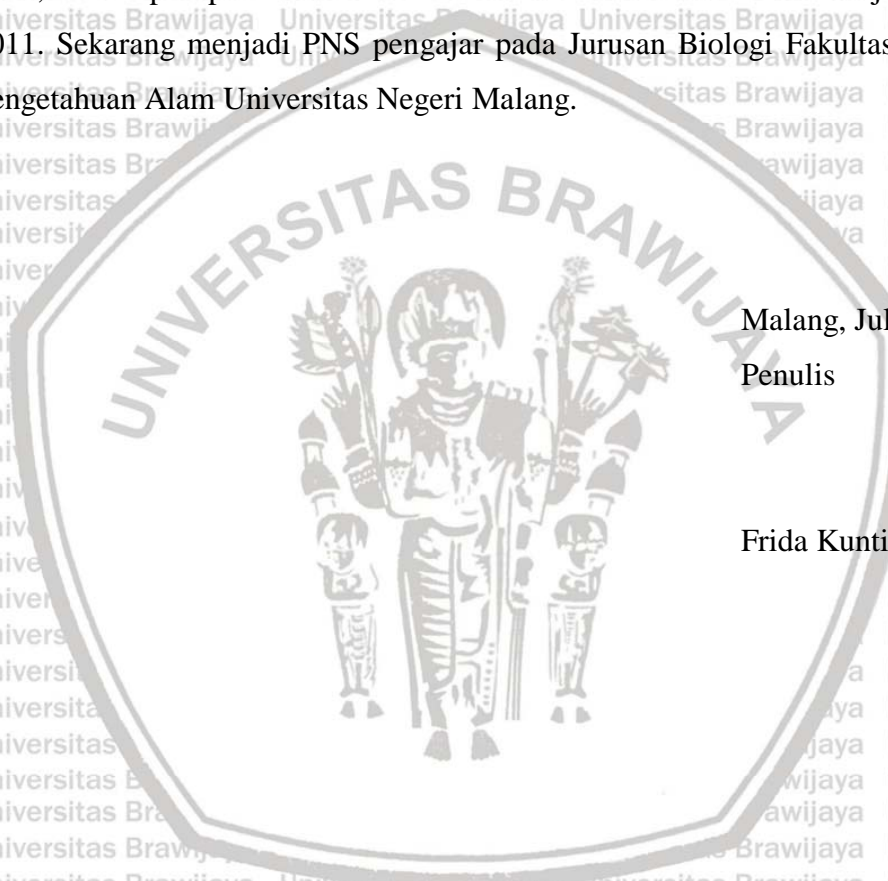
RIWAYAT HIDUP

Frida Kunti Setiowati, lahir di Malang, 23 Mei 1973, putri dari ayah Tasmonoheni dan ibu Tatik Teguh Madijanti, lulus SMA di Malang tahun 1991, menempuh pendidikan D-III pada Jurusan Teknik Kimia Politeknik Universitas Brawijaya Malang lulus tahun 1994 dan alih jenjang pada pendidikan S1 Teknik Kimia Institut Teknologi Nasional Malang lulus tahun 1997, menempuh pendidikan S2 di Jurusan Kimia Universitas Brawijaya Malang lulus tahun 2011. Sekarang menjadi PNS pengajar pada Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Malang.

Malang, Juli 2021

Penulis

Frida Kunti Setiowati



PEDOMAN PENGGUNAAN DISERTASI

Disertasi ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar Pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipan hanya dapat dilakukan seizin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.



RINGKASAN

Produksi dan Profil Komponen Senyawa Bioaktif Organosulfur pada Kultur Suspensi Sel Bawang Putih (*Allium sativum* L.) Tunggal Sebagai Respon Terhadap Pemberian Prekursor dan Elisitor

Frida Kunti Setiowati, Wahyu Widoretno, Sasangka Prasetyawan, Betty Lukiaty
Program Pascasarjana Universitas Brawijaya 2021

Bawang putih (*Allium sativum*. L) tunggal merupakan salah satu tanaman herbal yang saat ini banyak dimanfaatkan untuk pengobatan berbagai macam gangguan kesehatan, seperti anti diabetes, anti hipertensi, anti kolesterol, anti atheroskeloris, anti oksidan, anti virus, anti mikrobial, dan anti kanker. Manfaat penting dari kandungan senyawa bioaktif organosulfur pada bawang putih tunggal menyebabkan permintaan konsumen akan bawang putih tunggal terus meningkat hingga 20-30% per tahun. Kebutuhan tersebut tidak didukung dengan ketersediaan bawang putih tunggal yang memadai karena dari 1 ton hasil panen bawang putih hanya diperoleh 5-6 kg bawang putih tunggal. Hal ini disebabkan bawang putih tunggal dihasilkan dari benih bawang putih dengan pembentukan tunas lateral terhambat sehingga hanya menghasilkan satu siung saja. Kondisi tersebut menyebabkan diperlukannya suatu upaya untuk meningkatkan senyawa bioaktif organosulfur dalam bawang putih tunggal dengan metode alternatif.

Metode alternatif untuk memproduksi senyawa bioaktif tanaman adalah teknik kultur suspensi sel. Teknik kultur suspensi sel memiliki beberapa kelebihan yaitu seluruh sel dapat terdistribusi merata dalam medium sehingga multiplikasi lebih cepat, memungkinkan dilakukan secara kontinyu, serta dapat diaplikasikan dalam skala besar. Strategi untuk meningkatkan produksi senyawa bioaktif organosulfur pada bawang putih tunggal melalui kultur suspensi sel adalah dengan pemberian prekursor dan elisitor. Pemberian prekursor didasarkan pada beberapa senyawa yang merupakan senyawa intermediet atau yang menjadi substrat pada jalur biosintesis senyawa bioaktif yang dapat meningkatkan produk akhir. Dalam jalur biosintesis senyawa organosulfur, glutathione dan sistein merupakan senyawa yang berperan sebagai prekursor yang dapat meningkatkan biosintesis senyawa organosulfur bawang putih tunggal. Reaksi antara glutathione dengan senyawa allil dan sistein dengan senyawa allil akan menghasilkan produk akhir senyawa organosulfur.

Elisitor merupakan senyawa yang ketika diintroduksi dalam konsentrasi kecil pada sistem sel hidup dapat meningkatkan biosintesis senyawa tertentu. Logam merupakan salah satu elisitor yang dapat meningkatkan bioakumulasi senyawa bioaktif. Beberapa jenis logam seperti Fe dan Zn telah terbukti dapat meningkatkan produksi senyawa bioaktif pada beberapa tanaman. Elisitor logam akan ditangkap oleh reseptor membentuk kompleks logam-reseptor yang akan menyebabkan terjadinya proses penyampaian pesan (sinyal transduksi). Sinyal transduksi akan mengaktifkan gen-gen untuk faktor transkripsi. Gen-gen faktor transkripsi akan mengaktifkan gen-gen untuk enzim-enzim yang berperan dalam jalur biosintesis senyawa bioaktif.

Metode penelitian yang dilakukan terdiri dari penelitian kuantitatif dan kualitatif. Penelitian kuantitatif merupakan penelitian eksperimental yang dilakukan di laboratorium. Tahapan yang dilakukan adalah induksi kalus, inisiasi kultur suspensi sel, perlakuan

penambahan prekursor dan elisitor, ekstraksi dan analisis kadar serta profil komponen senyawa bioaktif organosulfur. Penelitian kualitatif dilakukan untuk melihat interaksi antara prekursor (ligan) dengan enzim-enzim yang berperan dalam lintasan biosintesis senyawa organosulfur (protein target) dengan menggunakan pendekatan *in silico* (bioinformatika). Penelitian dilakukan dengan menggunakan beberapa *software* dan *web server* dari program komputasi untuk memprediksi peran dan potensi prekursor dengan cara melakukan proses molekular docking antara ligan-protein target.

Induksi kalus dilakukan dengan mengkultur eksplan (*crown*, tunas tengah, tunas ujung) pada medium Murashige & Skoog (MS) dengan zat pengatur tumbuh 2,4 D 0,3 ppm dan kinetin 0,5 ppm. Ketiga jenis eksplan memberikan respon yang berbeda dalam pembentukan kalus, karena tidak semua eksplan dapat membentuk kalus. Eksplan *crown* berhasil membentuk kalus, sedangkan eksplan tunas ujung dan tengah tidak berhasil membentuk kalus. Kalus remah yang dihasilkan dari eksplan *crown* sesuai digunakan untuk inisiasi kultur suspensi sel dan produksi senyawa bioaktif organosulfur. Kultur suspensi sel dihasilkan dengan memindahkan kalus remah ke dalam medium cair MS dengan zat pengatur tumbuh 2,4 D 0,3 ppm dan kinetin 0,5 ppm. Kultur suspensi sel ini selanjutnya digunakan untuk memperoleh senyawa bioaktif organosulfur dengan pemberian prekursor dan elisitor.

Pemberian elisitor Fe^{3+} dan Zn^{2+} pada medium kultur berpengaruh terhadap pertumbuhan kultur suspensi sel bawang putih tunggal. Elisitor Fe^{3+} dan Zn^{2+} dapat meningkatkan berat basah, berat kering, *Settled Cell Volume* (SCV) dan indeks pertumbuhan kultur suspensi sel bawang putih tunggal. Berat basah, berat kering, SCV dan indeks pertumbuhan semakin tinggi dengan bertambahnya konsentrasi elisitor Fe^{3+} dan Zn^{2+} (0,1-0,5 mM). Glutation dan sistein sebagai *prekursor feeding* yang ditambahkan pada medium kultur juga meningkatkan berat basah, berat kering, SCV dan indeks pertumbuhan kultur suspensi sel bawang putih tunggal. Pertumbuhan kultur suspensi sel mengalami peningkatan mulai konsentrasi 5 mM dan mencapai maksimum pada konsentrasi 10 mM.

Analisis senyawa organosulfur dengan menggunakan teknik HPLC menunjukkan hasil bahwa pemberian elisitor Fe^{3+} maupun Zn^{2+} dalam medium kultur mampu meningkatkan kadar senyawa bioaktif organosulfur. Semua jenis senyawa bioaktif organosulfur yang dihasilkan dengan elisitasi menggunakan Fe^{3+} meningkat dengan semakin bertambahnya konsentrasi elisitor. Konsentrasi Fe^{3+} 0,5 mM dapat meningkatkan senyawa organosulfur paling tinggi, sekitar 1,5 kali lebih tinggi dibandingkan kontrol. Kadar beberapa senyawa bioaktif organosulfur yang dihasilkan dengan penambahan 0,3 mM Zn^{2+} meningkat sekitar 2 kali lebih tinggi dibandingkan kontrol. Glutation dan sistein juga meningkatkan kadar senyawa bioaktif organosulfur tertinggi pada pemberian prekursor dengan konsentrasi 12,5 mM.

Hasil visualisasi molekular docking menunjukkan terbentuknya kompleks glutation-glutation transferase (GSTU24) dan sistein-glutamat sistein ligase (GSH1) dengan afinitas pengikatan masing-masing 6,5 kcal/mol dan -4,5 kcal/mol. Enzim GSTU24 diprediksi mengkatalis glutation menjadi S-2 karboksi propil glutation, sedangkan glutamat sistein ligase (GSH1) diprediksi mengkatalis sistein menjadi γ -glutamil sistein.

Pada penelitian ini diperoleh metode alternatif untuk meningkatkan kadar senyawa bioaktif organosulfur melalui metode kultur suspensi sel melalui elisitasi dan *precursor feeding* dan profil komponen senyawa bioaktif organosulfur pada kultur suspensi sel bawang putih tunggal. Metode alternatif ini diharapkan dapat membantu produksi senyawa bioaktif organosulfur dalam skala besar untuk meningkatkan ketersediaan senyawa bioaktif organosulfur yang mempunyai manfaat penting dalam bidang kesehatan.

SUMMARY

Production and Profile of Organosulfur Bioactive Compounds in Cell Suspension Culture of Single Garlic (*Allium sativum* L.) as a Response to Precursor Feeding and Elicitor

Frida Kunti Setiowati, Wahyu Widoretno, Sasangka Prasetyawan, Betty Lukiaty
Postgraduate Program Brawijaya University 2021

Single garlic (*Allium sativum* L.) is one of the herbal plants widely used as a remedy to overcome various health problems, such as anti-diabetes, anti-hypertensive, anti-cholesterol, anti-atherosclerosis, anti-oxidant, anti-virus, anti-microbial, and anti-cancer. The important benefit of the organosulfur bioactive compounds content in single garlic causes consumer demand to increase by 20-30% per year. The needs is not supported by the availability of adequate single garlic because from 1 ton of garlic harvest, only 5-6 kg of single garlic was obtained. This is because single garlic was produced from garlic seeds with inhibited lateral shoot formation so that produced one clove only. This condition causes needed an effort to increase organosulfur bioactive compounds of single garlic with alternative methods.

Cell culture is an alternative method for producing plant bioactive compounds. The cell suspension culture technique has advantages such as cells can be evenly distributed in the medium which caueses faster multiplication, allows it to be carried out continuously, and can be applied on a large scale. The strategy to increase the production of organosulfur bioactive compounds through cell suspension culture is by giving precursors and elicitors. Precursor feeding is based on several compounds which are intermediate compounds or which become substrates in the biosynthetic pathway of bioactive compounds that can increase the final product. In the biosynthetic pathway of organosulfur compounds, glutathione and cysteine can act as precursors that can increase the biosynthesis of single garlic organosulfur compounds. The reaction between glutathione with allyl compounds and cysteine with allyl compounds will produce end products of organosulfur compounds.

Elicitors are compounds that when introduced in small concentrations into living cell systems can increase the biosynthesis of certain compounds. Metal is one of the elicitors that can increase the bioaccumulation of bioactive compounds. The metals such as Fe and Zn have been shown to increase the production of bioactive compounds in some plants. The metal elicitor will be captured by the receptor to form a metal-receptor complex which will cause the signal transduction. Signal transduction will activate genes for transcription factors. Transcription factor genes will activate genes for enzymes that play a role in the biosynthetic pathway of bioactive compounds.

The research method consists of quantitative and qualitative research. Quantitative research is an experimental research conducted in a laboratory. The steps taken were callus induction, initiation of cell suspension culture, addition of precursor and elicitor treatment, extraction and analysis of content and profiles of organosulfur bioactive compounds. Qualitative research was conducted to examine the interaction between precursors (ligands) and enzymes that play a role in the biosynthetic pathway of organosulfur compounds (target proteins) using an in silico approach (bioinformatics). The research was conducted using

several software and web servers from computational programs to predict the role and potential of precursors by carrying out a molecular docking process between target ligands and proteins.

Callus induction was carried out by culturing explants (crown, middle shoot, tip shoot) on Murashige & Skoog (MS) medium with growth regulators 0.3 ppm 2.4 D and 0.5 ppm kinetin. The three types of explants gave different responses in inducing callus. The crown explant was succeed in inducing callus, while the tip and middle shoot explants failed in inducing callus. Friable callus produced from crown explants is suitable for the initiation of cell suspension culture and the production of organosulfur bioactive compounds. Cell suspension cultures were produced by transferring friable callus into MS liquid medium with growth regulators 0.3 ppm 2.4 D and 0.5 ppm kinetin. This cell suspension culture was then used to obtain organosulfur bioactive compounds by precursor feeding and addition of elicitors.

The addition of elicitor Fe^{3+} and Zn^{2+} in culture medium affected the growth of single cell suspension culture of garlic. Elicitors Fe^{3+} and Zn^{2+} can increase the fresh weight, dry weight, Settled Cell Volume (SCV) and growth index of single cell suspension culture of garlic. Fresh weight, dry weight, SCV and growth index increased with increasing concentrations of Fe^{3+} and Zn^{2+} (0.1-0.5 mM). Glutathione and cysteine as feeding precursors added to the culture medium also increased the fresh weight, dry weight, SCV and growth index of single cell suspension culture of garlic. The growth of the cell suspension culture increased starting at 5 mM and reached a maximum at 10 mM.

Analysis of organosulfur compounds using the HPLC showed that the addition of Fe^{3+} and Zn^{2+} elicitors in the culture medium was able to increase the levels of organosulfur bioactive compounds. All types of organosulfur bioactive compounds produced by elicitation using Fe^{3+} increased with increasing elicitor concentration. Fe^{3+} 0.5 mM can increase the highest organosulfur compounds, about 1.5 times higher than the control. The contents of several organosulfur bioactive compounds produced by the addition of 0.3 mM Zn^{2+} increased about 2 times higher than the control. Glutathione and cysteine also increased the highest contents of organosulfur bioactive compounds when the precursor was given at 12.5 mM.

The results of molecular docking visualization showed the formation of glutathione-glutathione transferase (GSTU24) and cysteine-glutamate cysteine ligase (GSH1) complexes with binding affinity of 6.5 kcal/mol and -4.5 kcal/mol, respectively. The GSTU24 enzyme is predicted to catalyze glutathione to S-2 karboksi propil glutathione, while glutamate cysteine ligase (GSH1) is predicted to catalyze cysteine to -glutamil cysteine.

In this study, an alternative method was obtained to increase the levels of organosulfur bioactive compounds through cell suspension culture method through elicitation and precursor feeding and profiles of organosulfur bioactive compounds in single garlic cell suspension culture. This alternative method is expected to assist the production of organosulfur bioactive compounds on a large scale to increase the availability of organosulfur bioactive compounds which have important benefits in the health field.

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah Robbil ‘Alamiin, dengan ungkapan rasa syukur pada Allah Yang Maha Kuasa, akhirnya penulis dapat menyelesaikan penyusunan disertasi yang merupakan syarat untuk memperoleh gelar Doktor dalam bidang Biologi di Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang.

Pada kesempatan ini, penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada :

1. Dr. Wahyu Widoretno, M.Si selaku Promotor yang telah mendampingi dan memberi pengarahan serta tambahan ilmu dan saran-saran yang berguna bagi penulis.
2. Dr. Edi Priyo Utomo, M.S, (alm) selaku Ko-Promotor I yang telah memberi pengarahan serta tambahan ilmu dan saran-saran yang berguna bagi penulis.
3. Dr. Sasangka Prasetyawan. M.S. selaku Ko-Promotor I yang telah memberi pengarahan serta tambahan ilmu dan saran-saran yang berguna bagi penulis.
4. Dr. Betty Lukiati, M.S. selaku Ko-Promotor II yang telah memberi pengarahan serta tambahan ilmu dan saran-saran yang berguna bagi penulis.
5. Ir. Retno Mastuti, M.Agr.Sc.,D.Agr.Sc. selaku Dosen Penguji I yang telah memberi saran yang bermanfaat demi perbaikan penyusunan disertasi.
6. Prof. Dr. Agr. H. Mohammad Amin selaku Dosen Penguji II yang telah memberi saran yang bermanfaat demi perbaikan penyusunan disertasi.
7. Dr. Dra. Serafinah Indriyani, M.Si selaku Dosen Penguji III yang telah memberi saran yang bermanfaat demi perbaikan penyusunan disertasi.
8. Orang tua penulis atas segala doa, dukungan, dan motivasi yang tidak terkira.
9. Rekan-rekan Biologi Angkatan 2017 dan seluruh civitas akademik Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Brawijaya.

Penulisan disertasi ini merupakan upaya optimal penulis sebagai sarana terbaik dalam pengembangan ilmu pengetahuan. Saran dan kritik yang membangun sangat diharapkan untuk menjadikan karya ini semakin bermanfaat.

Malang, Juli 2021

Penulis

DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN PENGESAHAN	i
SUSUNAN TIM PROMOTOR DAN PENGUJI	ii
PERNYATAAN ORISINALITAS DISERTASI	iii
RIWAYAT HIDUP	iv
PEDOMAN PENGGUNAAN DISERTASI	v
RINGKASAN	vi
SUMMARY	viii
KATA PENGANTAR	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN	xvii
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Permasalahan	5
1.3 Tujuan Penelitian	5
1.3.1 Tujuan umum	5
1.3.2 Tujuan khusus	5
1.4 Manfaat Penelitian	6
1.4.1 Manfaat teoritis	6
1.4.2 Manfaat praktis	6
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 Bawang Putih Tunggal (<i>Allium sativum</i> L)	7
2.2 Senyawa Kimia dari Bawang Putih	11
2.3 Biosintesis Senyawa Organosulfur	12
2.4 Senyawa Bioaktif Organosulfur dan Manfaatnya Bagi Kesehatan	13
2.5 Pertumbuhan Kultur Suspensi Sel	15
2.6 Potensi Kultur Suspensi Sel Untuk Produksi Senyawa Bioaktif Tanaman	17
2.7 Strategi Peningkatan Produksi Senyawa Bioaktif Pada Kultur Sel : Pemberian Prekursor dan Elisitor	19
2.7.1 Pemberian elisitor (Elisitasi)	20
2.7.1.1 Mekanisme elisitasi dalam meningkatkan senyawa bioaktif	21
2.7.1.2 Elisitor logam	23
2.7.2 Pemberian prekursor (<i>Precursor Feeding</i>)	24
2.8 Kerangka Konsep Penelitian	25
BAB III. METODE PENELITIAN	28
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	28

3.2	Kerangka Operasional	28
3.2.1	Penelitian kuantitatif	28
3.2.2	Penelitian kualitatif	29
3.3	Langkah Penelitian	31
3.3.1	Induksi dan multiplikasi kalus	31
3.3.2	Inisiasi dan multiplikasi suspensi sel	32
3.3.3	Pembuatan kurva pertumbuhan kultur suspensi sel	32
3.3.4	Elisitasi kultur suspensi sel dengan elisitor Fe ³⁺ dan Zn ²⁺	32
3.3.5	Pemberian prekursor (<i>precursor feeding</i>) glutation dan sistein pada kultur suspensi sel bawang putih tunggal	33
3.3.6	Evaluasi Pertumbuhan	33
3.3.6.1	Biomassa sel	34
3.3.6.2	Indeks pertumbuhan	34
3.3.6.3	<i>Settled Cell Volume</i> (SCV)	34
3.3.7	Analisis senyawa organosulfur	34
3.3.7.1	Ekstraksi senyawa organosulfur	35
3.3.7.2	Analisis kadar dan komponen senyawa organosulfur	35
3.3.8	Penelitian kualitatif	35
3.3.9	Rancangan penelitian	36
3.3.10	Analisis data	36
BAB IV.	HASIL DAN PEMBAHASAN	35
4.1	Pengaruh Jenis Eksplan Terhadap Pembentukan Kalus	37
4.2	Inisiasi dan Multiplikasi Kultur Suspensi Sel Bawang Putih Tunggal	39
4.3	Pengaruh Elisitasi Fe ³⁺ dan Zn ²⁺ Terhadap Pertumbuhan Kultur Suspensi Sel Bawang Putih Tunggal	42
4.4	Pengaruh Elisitasi Fe ³⁺ dan Zn ²⁺ Terhadap Produksi Senyawa Bioaktif Organosulfur pada Kultur Suspensi Sel Bawang Putih Tunggal	45
4.5	Pengaruh Pemberian Glutation dan Sistein Terhadap Pertumbuhan Kultur Suspensi Sel Bawang Putih Tunggal	54
4.6	Pengaruh Pemberian Glutation dan Sistein Terhadap Produksi Senyawa Bioaktif Organosulfur pada Kultur Suspensi Sel Bawang Putih Tunggal	57
4.7	Visualisasi Molekuler Docking pada Biosintesis Senyawa Organosulfur	65
4.8	Korelasi Pertumbuhan Kultur Suspensi Sel Bawang Putih Tunggal dengan Kadar Senyawa Bioaktif Organosulfur pada Perlakuan Elisitasi	67
4.9	Korelasi Pertumbuhan Kultur Suspensi Sel Bawang Putih Tunggal dengan Kadar Senyawa Bioaktif Organosulfur pada Perlakuan <i>Precursor Feeding</i>	69
4.10	Pembahasan Umum	71
BAB V.	KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1	Kesimpulan	78

5.2 Saran.....79

5.3 Rekomendasi.....79

DAFTAR PUSTAKA.....80

LAMPIRAN.....89



DAFTAR GAMBAR

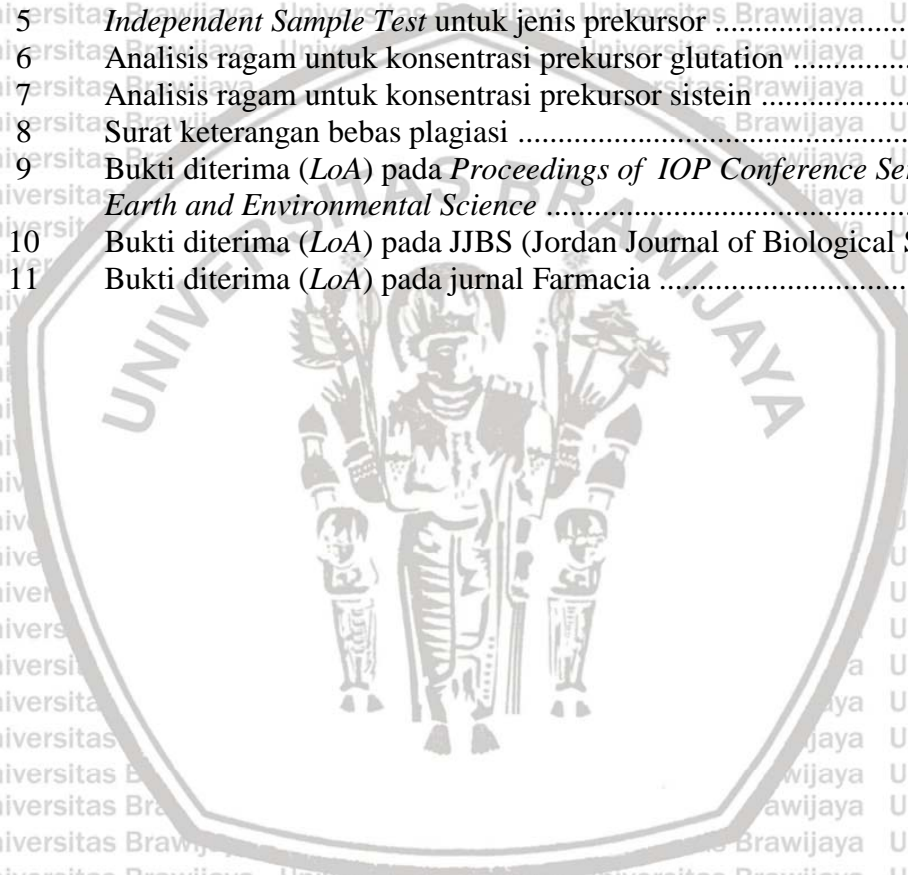
Nomor	Halaman
1	Bawang putih tunggal 7
2	Provinsi dengan produksi bawang putih terbesar 8
3	Produksi bawang putih di Indonesia Th. 2015-2019 (dalam ribu ton) . 9
4	Konsumsi bawang putih di Indonesia Th. 2015-2019 (dalam ribu ton) 9
5	Ekspor & impor bawang putih Th. 2015-2019 (dalam ton) 10
6	Senyawa organosulfur pada bawang putih 11
7	Biosintesis S-allil sistein sulfoksida (alliin) 14
8	Mekanisme elisitasi 22
9	Kerangka konsep penelitian 27
10	Kerangka operasional penelitian 30
11	Eksplan tunas bawang putih tunggal 31
12	Respon pertumbuhan tiga jenis eksplan pada medium induksi kalus (MS + 0,3 ppm 2,4-D + 0,5 ppm kinetin) selama 8 minggu kultur..... 37
13	Kalus untuk inisiasi dan kultur suspensi sel 39
14	Kurva pertumbuhan kultur suspensi sel bawang putih tunggal 40
15	Pengaruh perbedaan konsentrasi Fe^{3+} dan Zn^{2+} pada pertumbuhan biomassa dalam kultur sel suspensi bawang putih tunggal 43
16	Kromatogram HPLC senyawa bioaktif organosulfur dalam suspensi sel bawang putih tunggal dengan penambahan Fe^{3+} 46
17	Kromatogram HPLC senyawa bioaktif organosulfur dalam suspensi sel bawang putih tunggal dengan penambahan Zn^{2+} 47
18	Pengaruh elisitor Fe^{3+} terhadap kadar senyawa bioaktif organosulfur dalam suspensi sel bawang putih tunggal 51
19	Pengaruh elisitor Zn^{2+} terhadap kadar senyawa bioaktif organosulfur dalam suspensi sel bawang putih tunggal 52
20	Pengaruh perbedaan konsentrasi glutathion dan sistein pada pertumbuhan biomassa dalam kultur sel suspensi bawang putih tunggal 55
21	Kromatogram HPLC senyawa bioaktif organosulfur dalam suspensi sel bawang putih tunggal dengan penambahan glutathion 58
22	Kromatogram HPLC senyawa bioaktif organosulfur dalam suspensi sel bawang putih tunggal dengan penambahan sistein 59
23	Pengaruh glutathion terhadap kadar senyawa bioaktif organosulfur dalam suspensi sel bawang putih tunggal 63
24	Pengaruh sistein terhadap kadar senyawa bioaktif organosulfur dalam suspensi sel bawang putih tunggal 64
25	Kompleks yang terbentuk antara ligan glutathion (merah) - reseptor GSTU24 (abu-abu) 66
26	Kompleks yang terbentuk antara ligan sistein (merah) - reseptor GSH1(abu-abu) 67
27	Korelasi pertumbuhan kultur suspensi sel dengan kadar senyawa bioaktif organosulfur pada perlakuan elisitasi 69
28	Korelasi pertumbuhan kultur suspensi sel dengan kadar senyawa bioaktif organosulfur pada perlakuan <i>precursor feeding</i> 70

DAFTAR TABEL

Nomor		Halaman
1	Perkiraan Produksi Bawang Putih Tunggal Berdasarkan Produksi Bawang Putih Per Tahun	10
2	Aktifitas biologis senyawa organosulfur	16
3	Senyawa bioaktif dengan rendemen tinggi hasil dari kultur sel tanaman	17
4	Produksi Senyawa Bioaktif Tanaman Melalui Kultur Suspensi Sel	18
5	Produksi Senyawa Bioaktif Tanaman Skala Komersial	18
6	Klasifikasi Elisitor	21
7	Penggunaan Elisitor Abiotik (Logam) Untuk Peningkatan Produksi Senyawa Bioaktif Pada Kultur Sel Tanaman	23
8	Penggunaan Prekursor Untuk Peningkatan Produksi Senyawa Bioaktif Pada Kultur Suspensi Sel Tanaman	24
9	Macam dan kandungan senyawa bioaktif organosulfur pada suspensi sel bawang putih tunggal dengan perlakuan elisitor Fe^{3+}	49
10	Macam dan kandungan senyawa bioaktif organosulfur pada suspensi sel bawang putih tunggal dengan perlakuan elisitor Zn^{2+}	50
11	Macam dan kandungan senyawa bioaktif organosulfur pada suspensi sel bawang putih tunggal dengan perlakuan prekursor glutation	61
12	Macam dan kandungan senyawa bioaktif organosulfur pada suspensi sel bawang putih tunggal dengan perlakuan prekursor sistein	62

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor		Halaman
1	Komposisi media MS	91
2	<i>Independent Sample Test</i> untuk jenis elisitor	92
3	Analisis ragam untuk konsentrasi elisitor Fe^{3+}	94
4	Analisis ragam untuk konsentrasi elisitor Zn^{2+}	98
5	<i>Independent Sample Test</i> untuk jenis prekursor	102
6	Analisis ragam untuk konsentrasi prekursor glutation	103
7	Analisis ragam untuk konsentrasi prekursor sistein	107
8	Surat keterangan bebas plagiasi	111
9	Bukti diterima (LoA) pada <i>Proceedings of IOP Conference Series : Earth and Environmental Science</i>	112
10	Bukti diterima (LoA) pada JJBS (Jordan Journal of Biological Science)	113
11	Bukti diterima (LoA) pada jurnal Farmacia	114



DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN

Simbol /Singkatan

SCV

HPLC

MS

LAF

ANOVA

ROS

GSTU24

GSH1

GGT

CDPKs

Keterangan

settled cell volume

high performance liquid chromatography

Murashige & Skoog

laminar air flow

analysis of variance

reactive oxygen species

glutation transferase U24

glutamat sistein ligase 1

γ -glutamil transpeptidase

calcsium-dependent kinase

Simbol /Singkatan

g

mM

ppm

γ

Nama unit

gram

milimolar

part per million

gamma

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Bawang putih (*Allium sativum*, L) termasuk dalam famili Liliaceae, merupakan salah satu tanaman herbal yang penggunaan dan manfaatnya bagi kesehatan menempati urutan tertinggi (Chekki *et al.*, 2014). Bawang putih tunggal adalah bawang putih yang dihasilkan dari benih bawang putih dengan pembentukan tunas lateral terhambat sehingga hanya menghasilkan satu siung saja dari tunas utama di bagian tajuk. Perbedaan karakteristik organoleptik antara kedua bawang tersebut dapat dilihat dari warna dan rasa/bau yang dimiliki. Bawang putih mempunyai warna kekuningan sedangkan bawang putih tunggal mempunyai warna kuning keputihan. Rasa/bau pada bawang putih tunggal lebih tajam dan lebih menyengat dibandingkan dengan bawang putih (Bharat 2014).

Bawang putih mengandung banyak sekali metabolit sekunder yang secara biologi mempunyai manfaat penting. Sebagian besar senyawa tersebut mengandung sulfur yang bertanggungjawab terhadap rasa, aroma dan sifat-sifat farmakologi bawang putih (Hernawan, 2003; Crozier *et al.*, 2006). Beberapa senyawa organosulfur penting yang terdapat dalam bawang putih antara lain alliin, allisin, kelompok allil sulfida, kelompok vinil dithiin, ajoen (Ramirez, 2017). Alliin dapat dihasilkan melalui jalur glutathion dan jalur sistein yang masing-masing bereaksi dengan sumber allil (Borlinghaus, 2014). Pada jalur glutathion, konjugasi antara glutathion dengan metakrilil-CoA menghasilkan S-(2-karboksi propil)glutathion. Pengeluaran gugus glikil dari S-(2-karboksi propil)glutathion menghasilkan S-(2-karboksi propil)sistein. Pada jalur sistein, konjugasi antara sistein dengan metakrilil-CoA menghasilkan S-(2-karboksi propil)sistein. Gugus S-2-karboksi propil pada S-(2-karboksi propil)sistein yang merupakan senyawa antara yang sama dari dua jalur tersebut diubah menjadi gugus S-2-propenil melalui dekarboksidasi oksidatif menjadi γ -glutamil-S-2-propenilsistein (γ -glutamil-S-allil sistein). γ -glutamil-S-allil sistein selanjutnya mengalami penghilangan gugus γ -glutamil menjadi S-allil sistein. Oksigenasi terhadap S-allil sistein menghasilkan S-allil sistein sulfoksida atau alliin (Yoshimoto *et al.*, 2019). Alliin merupakan parental dari pembentukan kelompok senyawa organosulfur lain. Hidrolisis alliin oleh enzim alliinase akan menghasilkan senyawa intermediet asam allil sulfenat. Reaksi kondensasi asam allil sulfenat akan

menghasilkan allisin (Borlinghaus, 2014; Ramirez *et al.*, 2017). Allisin yang merupakan golongan thiosulfinat ini merupakan senyawa yang tidak stabil, dan dengan cepat dapat terdegradasi menjadi allil disulfida, ajoen (E-ajoen, Z-ajoen) dan dithiin (2 vinil 1,3 dithiin; 3 vinil 1,2 dithiin) dan senyawa sulphur yang lain (Arnault, 2001; Gruhlke, 2010).

Bawang putih tunggal saat ini lebih sering digunakan untuk mengatasi berbagai masalah kesehatan karena sifat terapeutiknya yang lebih kuat dibandingkan dengan bawang putih bersiung banyak (Bharat, 2014). Kandungan senyawa bioaktif dalam satu siung bawang putih tunggal setara dengan kandungan senyawa bioaktif dalam 5-6 siung bawang putih (Suprpto dalam Utami & Mardiana, 2014). Bawang putih dengan karakteristik baunya yang khas dan adanya kandungan senyawa bioaktif organosulfur, menjadikan bawang putih mempunyai berbagai fungsi biologis. Fungsi biologis tersebut antara lain antimikroba dan antioksidan (Akinmusire, 2014; Goncagul, 2010), antidiabetes (Habtemariam, 2019), anti atherosclerosis, anti thrombosis, anti hipertensi (Ugwu & Suru, 2016; Saljoughian *et al.*, 2017), dan anti kanker (Pourzand *et al.*, 2016).

Pemanfaatan bawang putih tunggal sebagai obat herbal banyak dikonsumsi dalam berbagai variasi olahan. Variasi olahan bawang putih tunggal antara lain diperam dalam madu untuk dijadikan manisan, diperam dalam larutan garam dan cuka untuk dijadikan acar, difermentasi untuk dijadikan *black garlic*, serta dibuat campuran jus sebagai minuman. Pengolahan tersebut dimaksudkan untuk mengurangi rasa dan aroma dari bawang putih tunggal yang menyengat. Manfaat penting dari kandungan senyawa bioaktif organosulfur pada bawang putih tunggal menyebabkan permintaan konsumen akan bawang putih tunggal terus meningkat hingga 20-30% per tahun (Utami & Mardiana, 2014), namun demikian kebutuhan tersebut tidak didukung dengan ketersediaan bawang putih tunggal yang memadai. Ketersediaan bawang putih tunggal sulit diperoleh, karena dari 1 ton hasil panen bawang putih hanya bisa didapatkan 5-6 kg bawang putih tunggal. Kondisi tersebut menyebabkan diperlukannya suatu upaya untuk meningkatkan senyawa bioaktif organosulfur dalam bawang putih tunggal dengan metode alternatif.

Dalam bidang farmasi, kultur sel dan jaringan tanaman dapat dijadikan alternatif sebagai sumber untuk mendapatkan senyawa bioaktif tanaman (Murthy, 2014). Faktor-faktor yang dapat membatasi ketersediaan senyawa bioaktif seperti musim, kondisi lingkungan, jenis tanah, dan umur tanaman yang terkait dengan kesulitan dalam penyebaran spesies tertentu

(Cherdshevasart 2007) dapat dihindari dengan penggunaan teknik kultur sel. Kelebihan dari kultur sel adalah dapat menghasilkan metabolit sekunder atau senyawa bioaktif yang lebih konsisten dan dalam waktu lebih singkat serta kondisi lingkungan yang dapat diatur dan dikendalikan. Kultur suspensi sel dikembangkan dengan mentransfer kalus yang relatif remah ke dalam medium cair yang dipertahankan pada suhu, kondisi penggojogan dan parameter fisik lainnya yang sesuai. Kalus dengan konsistensi remah sesuai digunakan untuk inisiasi kultur suspensi sel dan produksi senyawa bioaktif organosulfur.

Beberapa tipe kultur sel yang dapat digunakan untuk memproduksi metabolit sekunder atau senyawa bioaktif tanaman antara lain kultur kalus dan kultur organ serta kultur suspensi sel (Espinosa-Leal *et al.*, 2018). Dibandingkan dengan tipe kultur lainnya, kultur suspensi sel mempunyai beberapa kelebihan yaitu penggunaan medium cair dengan disertai penggojogan menyebabkan terjadi kontak langsung seluruh permukaan sel dengan medium dan proses aerasi yang lebih baik, sehingga menyebabkan sel-sel yang terdispersi dalam medium cair membentuk suspensi sel yang aktif tumbuh dengan laju pertumbuhan yang cepat. Kultur suspensi sel juga mampu menyediakan sel tanaman obat secara terus menerus dan dalam skala besar, yang selanjutnya digunakan sebagai sumber untuk menghasilkan senyawa bioaktif. Beberapa penelitian yang telah dilakukan untuk meningkatkan senyawa bioaktif melalui kultur suspensi sel antara lain; peningkatan asam fenolat pada kultur suspensi sel *Vitis vinifera* (Riedel *et al.*, 2012), akumulasi senyawa flavonoid pada kultur suspensi sel *Centella asiatica* L. (Tan *et al.*, 2013) dan peningkatan akumulasi scopoletin dalam kultur suspensi sel *Spilanthes acmella* Murr. (Abyari *et al.*, 2016).

Peningkatan senyawa bioaktif pada kultur sel dapat dilakukan dengan penambahan prekursor dan elisitor (Rao & Ravishankra 2002). Prekursor adalah senyawa yang digunakan sebagai senyawa pemula dalam reaksi pembentukan suatu metabolit, merupakan senyawa eksogen atau endogen yang dikonversi oleh sel tanaman menjadi metabolit sekunder melalui jalur biosintetik tanaman. Pemberian prekursor didasarkan bahwa biosintesis senyawa intermediet dari molekul bioaktif yang ditambahkan pada awal atau selama periode kultur dapat berfungsi sebagai substrat tambahan di dalam meningkatkan senyawa bioaktif pada kultur sel (Jackson dan Attalla 2010). Glutathione dan sistein merupakan senyawa yang berperan sebagai prekursor dalam lintasan biosintesis senyawa organosulfur bawang putih tunggal. Biosintesis beberapa senyawa organosulfur seperti allisin, kelompok allil disulfida, dithiin dan

ajoen berawal dari biosintesis alliin yang merupakan parental dari senyawa organosulfur tersebut. Senyawa bioaktif alliin dapat dihasilkan melalui dua jalur biosintesis, yang pertama adalah jalur glutathion yang bereaksi dengan sumber allil, dan yang kedua adalah jalur asam amino serin yang bereaksi dengan allil tiol (Borlinghaus, 2014). Beberapa hasil penelitian penggunaan prekursor yang mampu meningkatkan senyawa bioaktif pada beberapa tanaman antara lain; triptopan dengan konsentrasi 200 mg/L meningkatkan produksi alkaloid pada kultur kalus mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* [Scheff.]Boerl.) (Gusni *et al.*, 2015); triptopan dengan konsentrasi 150 mg/L meningkatkan produksi thymol dan prolin dengan konsentrasi 150 mg/L meningkatkan produksi coumarin pada kultur kalus *Verbascum thapsus* L (Al- Jibouri *et al.*, 2016); L-fenilalanin dengan konsentrasi 100 μ M meningkatkan produksi scopoletin pada kultur sel *Spilanthes acmella* Murr (Abyari *et al.*, 2016).

Penggunaan elisitor atau yang disebut dengan elisitasi, merupakan salah satu strategi yang efektif dalam meningkatkan produktivitas senyawa bioaktif (Sharma *et al.*, 2011; Giri & Zaheer, 2016). Elisitor merupakan senyawa yang diberikan dengan kadar kecil pada sistem sel hidup untuk menginisiasi atau meningkatkan biosintesis senyawa-senyawa tertentu (Namdeo, 2007). Logam merupakan salah satu jenis elisitor yang dapat meningkatkan bioakumulasi senyawa bioaktif (Ramakrishna dan Ravishankar, 2011). Dalam mekanismenya, elisitor logam akan ditangkap oleh reseptor membentuk kompleks logam-reseptor yang akan menyebabkan terjadinya proses penyampaian pesan (sinyal transduksi). Sinyal transduksi akan mengaktifasi gen-gen untuk faktor transkripsi. Gen-gen faktor transkripsi akan mengaktifasi gen-gen untuk enzim-enzim yang berperan dalam jalur biosintesis senyawa bioaktif. Hasil penelitian penggunaan elisitor dalam meningkatkan senyawa bioaktif pada beberapa tanaman antara lain elisitasi logam Zn^{2+} 0,2 mM yang mampu meningkatkan senyawa quercetin 2x lebih tinggi dibandingkan kontrol pada kultur kalus *Plucea lanceolata* (Kumar *et al.*, 2004), senyawa prolin 2x lebih tinggi dibandingkan kontrol pada kultur suspensi sel *Withania somnifera* (Fatima *et al.*, 2011) dan senyawa xanthotoxin 2x lebih tinggi dibandingkan kontrol pada kultur kalus *Ammi majus* (Katare *et al.*, 2014). Elisitasi logam Fe^{3+} 0,3 mM mampu meningkatkan senyawa red pigmen 8x dan yellow pigmen 20x lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol pada kultur suspensi sel *Cartamus tinctorius* (Chavan, 2010).

Berdasarkan latar belakang tersebut menunjukkan bahwa kultur suspensi sel mempunyai potensi besar untuk produksi senyawa bioaktif organosulfur pada bawang putih tunggal.

Manfaat yang dapat diperoleh adalah didapatkan metode alternatif untuk meningkatkan produksi senyawa bioaktif organosulfur pada bawang putih tunggal dengan metode kultur suspensi sel. Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat diperoleh metode alternatif untuk meningkatkan produksi senyawa bioaktif organosulfur pada bawang putih tunggal yaitu metode kultur suspensi sel yang dapat membantu mengatasi kekurangan akan ketersediaan senyawa bioaktif organosulfur yang mempunyai manfaat penting dalam bidang kesehatan.

1.2 Permasalahan

Permasalahan dari penelitian ini adalah;

- 1) Bagian mana dari ekplan bawang putih tunggal yang dapat memberikan respon terbaik terhadap induksi kalus?
- 2) Bagaimana pengaruh elisitor logam Fe^{3+} dan Zn^{2+} terhadap pertumbuhan sel, komponen dan kadar senyawa organosulfur pada bawang putih tunggal?
- 3) Bagaimana pengaruh prekursor glutation dan sistein terhadap pertumbuhan sel, komponen dan kadar senyawa organosulfur pada bawang putih tunggal?
- 4) Bagaimana mekanisme kerja prekursor sistein dan glutation terhadap biosintesis senyawa organosulfur pada bawang putih tunggal?
- 5) Bagaimana korelasi antara pertumbuhan sel dan akumulasi senyawa organosulfur pada kultur suspensi sel bawang putih tunggal?
- 6) Apakah kultur suspensi sel dapat meningkatkan produksi senyawa organosulfur pada bawang putih tunggal?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan umum

Tujuan umum dari penelitian ini adalah menemukan formula medium kultur suspensi sel terbaik dalam meningkatkan produksi senyawa bioaktif organosulfur bawang putih tunggal.

1.3.2 Tujuan khusus

- 1) Mengevaluasi bagian eksplan dari bawang putih tunggal yang dapat menghasilkan kalus.
- 2) Menganalisis pengaruh elisitor logam Fe^{3+} , Zn^{2+} dalam kultur suspensi sel bawang putih tunggal terhadap pertumbuhan sel, profil komponen dan kadar senyawa organosulfur.

- 3) Menganalisis pengaruh prekursor sistein, glutation dalam kultur suspensi sel bawang putih tunggal terhadap pertumbuhan sel, profil komponen dan kadar senyawa organosulfur.
- 4) Menganalisis mekanisme kerja prekursor sistein, glutation terhadap biosintesis senyawa organosulfur pada bawang putih tunggal melalui pendekatan *in silico*.
- 5) Menganalisis korelasi antara pertumbuhan sel dan akumulasi senyawa organosulfur pada kultur suspensi sel bawang putih tunggal
- 6) Menganalisis potensi kultur sel dalam meningkatkan produksi senyawa organosulfur pada kultur kalus bawang putih tunggal.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat teoritis

Manfaat teoritis dari penelitian ini adalah memberikan informasi profil komponen senyawa bioaktif organosulfur pada kultur suspensi sel bawang putih tunggal dan metode alternatif untuk meningkatkan kadar senyawa bioaktif organosulfur melalui metode kultur suspensi sel melalui elisitasi dan *precursor feeding*.

1.4.2 Manfaat praktis

Hasil penelitian ini dapat digunakan oleh peneliti lain sebagai acuan dalam mengembangkan penelitian berikutnya terkait dengan peningkatan produksi senyawa bioaktif organosulfur. Bagi pelaku industri farmasi, metode kultur suspensi sel dengan elisitasi dan *precursor feeding* dapat digunakan sebagai metode alternatif untuk produksi senyawa bioaktif organosulfur skala besar dengan menerapkan sistem kultur bioreaktor untuk meningkatkan ketersediaan senyawa bioaktif organosulfur yang mempunyai manfaat penting dalam bidang kesehatan.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Bawang Putih Tunggal (*Allium sativum* L.)

Bawang putih tunggal (*Allium sativum* L.) adalah bawang putih yang hanya mempunyai satu siung pada setiap umbinya. Bawang putih tunggal dengan kulit luar putih dan ukuran diameter berkisar antara 1,5 – 3 cm, merupakan bawang putih yang tumbuh pada lingkungan yang tidak sesuai sehingga bawang ini tidak berkembang dengan baik dan hanya berkembang menghasilkan satu siung saja (Untari, 2010),. Syamsiah dan Tajudin (2005), juga menyatakan hal sama bahwa bawang putih tunggal terbentuk secara tidak sengaja karena lingkungan penanaman yang tidak cocok. Umbi dari tanaman ini hanya berisi satu umbi utuh yang kecil, hal ini disebabkan karena yang terbentuk hanyalah tunas utama di bagian tajuk dan tunas tersebut menekan pembentukan tunas lateral bakal siung. Bawang putih tunggal memiliki karakteristik yang lebih tajam dan lebih menyengat terhadap rasa dan bau apabila dibandingkan dengan bawang putih bersiung banyak (Bharat, 2014). Hal ini mengindikasikan adanya senyawa bioaktif dengan kandungan sulfur dalam bawang putih tunggal yang lebih tinggi dibandingkan bawang putih, sehingga khasiatnya pun lebih tinggi dibandingkan pada bawang putih (Utami & Mardiana, 2013). Kandungan senyawa bioaktif dengan kandungan sulfat atau organosulfur organosulfur merupakan senyawa yang bertanggung jawab terhadap rasa dan sangat berkontribusi terhadap sifat bioaktif bawang putih termasuk pada produk turunannya.

Klasifikasi bawang putih tunggal (*Allium sativum* L.)



Gambar 1. Bawang putih tunggal (*Allium sativum* L.)
(sumber : dok pribadi)

Kingdom : Plantae
Divisi : Spermatophyta
Sub divisi : Angiospermae
Klas : Monocotyledone
Ordo : Lilyflorae
Famili : Liliaceae
Genus : *Allium*
Spesies : *Allium sativum*

Jawa tengah, Jawa Timur dan Nusa Tenggara Barat merupakan provinsi dengan produksi bawang putih terbesar di Indonesia. Jawa Tengah dengan luas panen 5,289 Ha dapat memberikan kontribusi terhadap produksi nasional tertinggi (Gambar 2). Beberapa varietas dari bawang putih tunggal yang dihasilkan dari Jawa tengah antara lain Lumbu Hijau, Lumbu Kuning, Sangga Sembalun dan Tawangmangu Baru. Saat ini budidaya bawang putih yang sedang digalakkan adalah menggunakan benih varietas Tawangmangu Baru. Varietas Tawangmangu Baru memiliki keunggulan dalam hal produksi dan kualitas dibandingkan dengan varietas yang lain (Tempo, 2015).



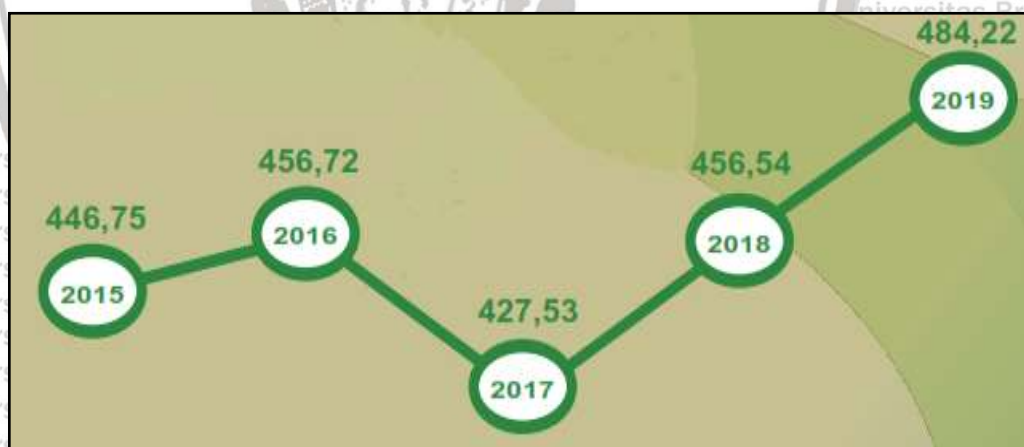
Gambar 2. Provinsi dengan produksi bawang putih terbesar
Sumber: Badan Pusat Statistik, Statistik Hortikultura Th. 2019

Bawang putih tunggal diperoleh bersamaan pada saat panen bawang putih, namun bawang putih tunggal ini tidak bisa dihasilkan dalam jumlah yang banyak karena dari 1 ton hasil panen bawang putih hanya bisa didapatkan ± 5 -6 kg bawang putih tunggal. Data yang bersumber dari Badan Pusat Statistik Holtikultura Tahun 2019 menunjukkan adanya peningkatan produksi bawang putih dari tahun 2015 hingga tahun 2019. Pada tahun 2019, produksi bawang putih naik 49,5 ribu ton dibanding tahun 2018 (Gambar 3). Kenaikan tersebut belum bisa mencukupi kebutuhan masyarakat Indonesia karena kebutuhan rata-rata per tahun berkisar antara 450-500 ribu ton. Tahun 2017 hingga 2019 kebutuhan akan bawang putih cenderung semakin meningkat (Gambar 4). Lahan produksi bawang putih di Indonesia saat ini mencapai ± 11.000 ha yang setiap hektarnya mampu memproduksi 8 - 10 ton bawang

putih. Jadi produksi dalam negeri akan bawang putih masih sangat jauh dari angka kebutuhan masyarakat. Sampai saat ini Indonesia masih rutin mengimpor bawang putih, \pm 95% dari kebutuhan bawang putih bergantung pada impor dan impor bawang putih terbanyak berasal dari China (Gambar 5).



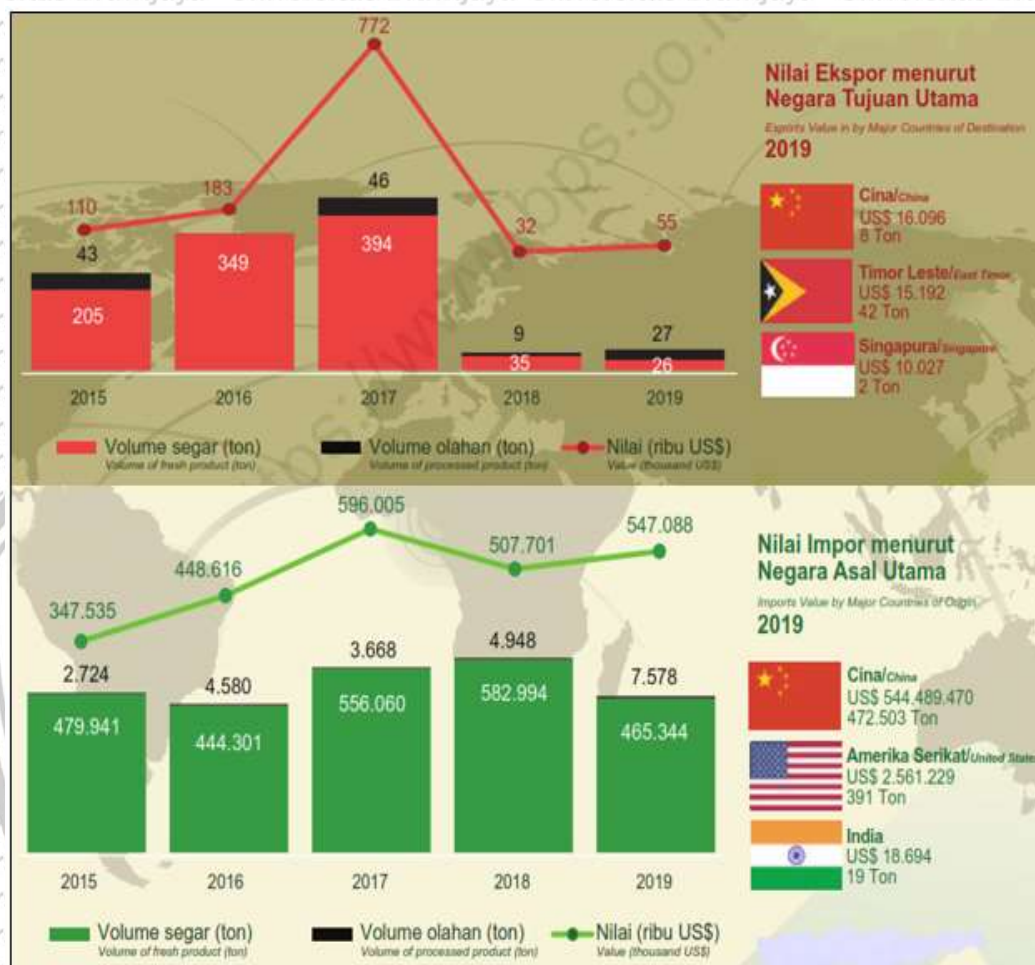
Gambar 3. Produksi bawang putih di Indonesia Th. 2015-2019 (dalam ribu ton)
Sumber: Badan Pusat Statistik, Statistik Hortikultura Th. 2019



Gambar 4. Konsumsi bawang putih di Indonesia Th. 2015-2019 (dalam ribu ton)
Sumber: Badan Pusat Statistik, Statistik Hortikultura Th. 2019

Bawang putih tunggal saat ini lebih sering dimanfaatkan sebagai ramuan herbal dalam bidang pengobatan. Secara tradisional banyak digunakan untuk mengatasi berbagai gangguan kesehatan antara lain flu, batuk, maag, gatal-gatal pada kulit, demam, asam urat dan mengurangi resiko jantung. Manfaat tersebut disebabkan karena adanya kandungan volatile oil dan kandungan beberapa senyawa aktif lainnya (Bharat 2014) dan kandungan senyawa

bioaktif dalam bawang putih tunggal lebih tinggi dibandingkan dengan bawang putih bersiung banyak (Utami & Mardiana, 2014; Lestari & Rifa'i, 2017).



Gambar 5. Ekspor & Impor bawang putih Th. 2015-2019 (dalam ton)

Sumber: Badan Pusat Statistik, Statistik Hortikultura Th. 2019

Dari data tersebut ketersediaan akan bawang putih tunggal dapat diprediksi dengan memperkirakan bahwa bawang putih tunggal yang dapat diproduksi setiap tahunnya adalah 5-6 kg bawang putih tunggal dalam setiap ton produksi bawang putih (Tabel 1).

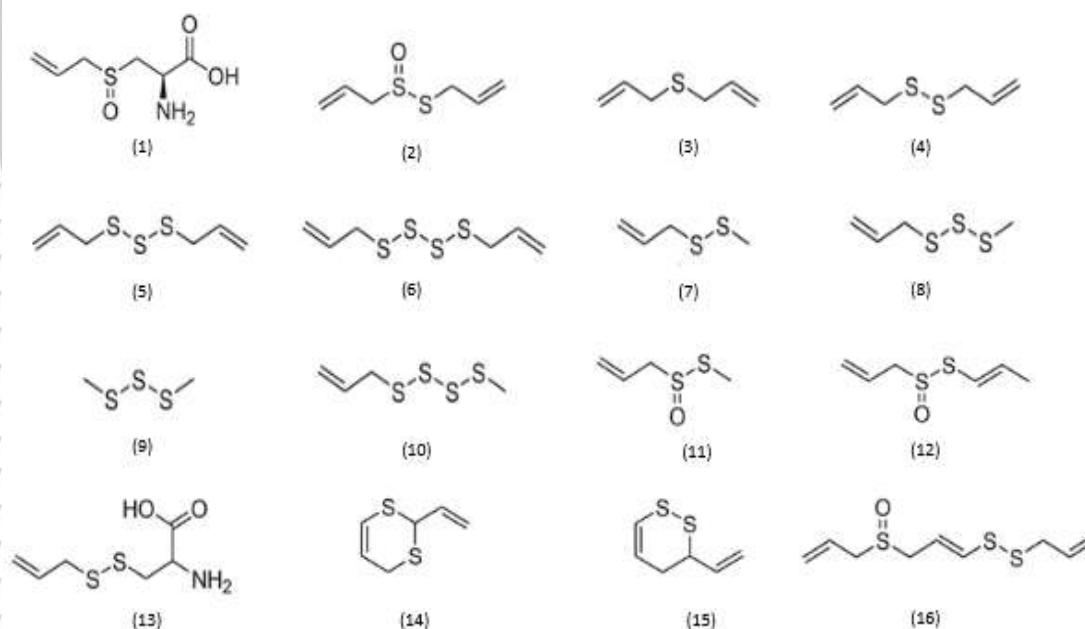
Tabel 1. Perkiraan Produksi Bawang Putih Tunggal Berdasarkan Produksi Bawang Putih per Tahun

	Th. 2015	Th. 2016	Th. 2017	Th. 2018	Th. 2019
Produksi bawang putih (Ton)	20.290	21.150	19.510	39.300	88.820
Prediksi produksi Bawang putih tunggal (Ton)*	101,5	105,7	97,6	196,5	444,1

*Ket : Perkiraan produksi bawang putih tunggal dihitung berdasarkan hasil panen bawang putih yaitu 5-6 kg/ton bawang putih

2.2 Senyawa Kimia dalam Bawang Putih

Bawang putih memiliki kandungan nilai gizi sebesar 410,7 kkal/100 g yang meliputi 33 g karbohidrat; 0,34 g lemak; 9,26 g protein; 1,2 mg vitamin B6; 5,29 mg zat besi; 36,3 mg kalsium; dan 600,9 mg fosfor (Leustek *et al.*, 2000). Prosentase senyawa kimia yang ada di dalam umbi bawang putih meliputi air 65%, karbohidrat 28%, protein 2%, asam amino 1,2%, serat 1,5%, dan senyawa organosulfur 2,3% (Nouroz *et al.*, 2015). Senyawa bioaktif dalam bawang putih secara keseluruhan dilaporkan terdapat lebih dari 100 macam senyawa yang secara biologi sangat bermanfaat (Challem, 1995). Kurang lebih sejumlah 33 dari senyawa tersebut adalah senyawa organosulfur (Palani *et al.*, 2014). Senyawa organosulfur merupakan senyawa yang kaya akan kandungan belerang sehingga menyebabkan bawang putih ini mempunyai karakteristik rasa dan bau yang khas (Crozier *et al.*, 2006) serta sifat yang berperan dalam fungsi farmakologi (Hernawan 2003) (Gambar6).



Gambar 6. Senyawa organosulfur pada bawang putih : alliin (1); Allisin(2); diallil sulfida (3); diallil disulfida (4); diallil trisulfida (5); diallil tetrasulfida (6); allil metil disulfida (7); allil metil trisulfida (8); dimetil trisulfida (9); allil metil tetrasulfida (10); metil allil tiosulfinat (11); 1-propenil allil tiosulfinat (12); S-allil merkaptosistein (13); 2-vinil 4H 1,3-ditiin (14); 3-vinil 4H 1,2-ditiin (15); Ajoen (16)

Sumber : Putnik, 2019

S-allil sistein sulfoksida atau alliin merupakan senyawa sulfoksida (turunan dari sulfida teroksidasi), yaitu senyawa kimia yang mengandung gugus fungsi sulfinil (SO) yang melekat

pada dua atom karbon. Allisin merupakan senyawa yang memiliki gugus fungsi tiosulfonat R-S(O)-S-R. Senyawa ini terbentuk akibat aktivitas enzim alliinase (Block, 1985). Dekomposisi dari Allisin dapat menghasilkan beberapa senyawa organosulfur lainnya, yaitu ajoen, 2 jenis senyawa siklik vinil dithiin dan beberapa senyawa kelompok allil sulfida.

2.3. Biosintesis Senyawa Organosulfur

Pada biosintesis senyawa organosulfur, alliin merupakan parental dari pembentukan kelompok senyawa organosulfur lain (allisin, allil sulfida, dithiin dan ajoen). Ketersediaan sistein dan glutathione sangat penting dalam biosintesis alliin (Gambar 7). Glutathione merupakan tripeptida dari sistein, glisin dan asam glutamat, sedangkan sistein merupakan asam amino memegang peranan penting dalam metabolisme nitrogen - karbon dan menjadi prekursor yang esensial untuk semua senyawa biologis organosulfur termasuk alliin (Hofgen *et al.* 2001). Jalur biosintesis alliin dari glutathione meliputi 5 tahapan reaksi, yaitu (i) konjugasi S-glutathione; (ii) penghilangan gugus glikil; (iii) modifikasi kelompok S-alk(en)il; (iv) penghilangan gugus γ -glutamil; dan (v) S-oksigenasi. Sebagian besar reaksi-reaksi tersebut dikatalisis oleh enzim spesifik. Enzim untuk menghilangkan gugus γ -glutamil dan mengkatalisis S-oksigenasi yang sampai saat ini telah diidentifikasi pada tingkat molekuler.

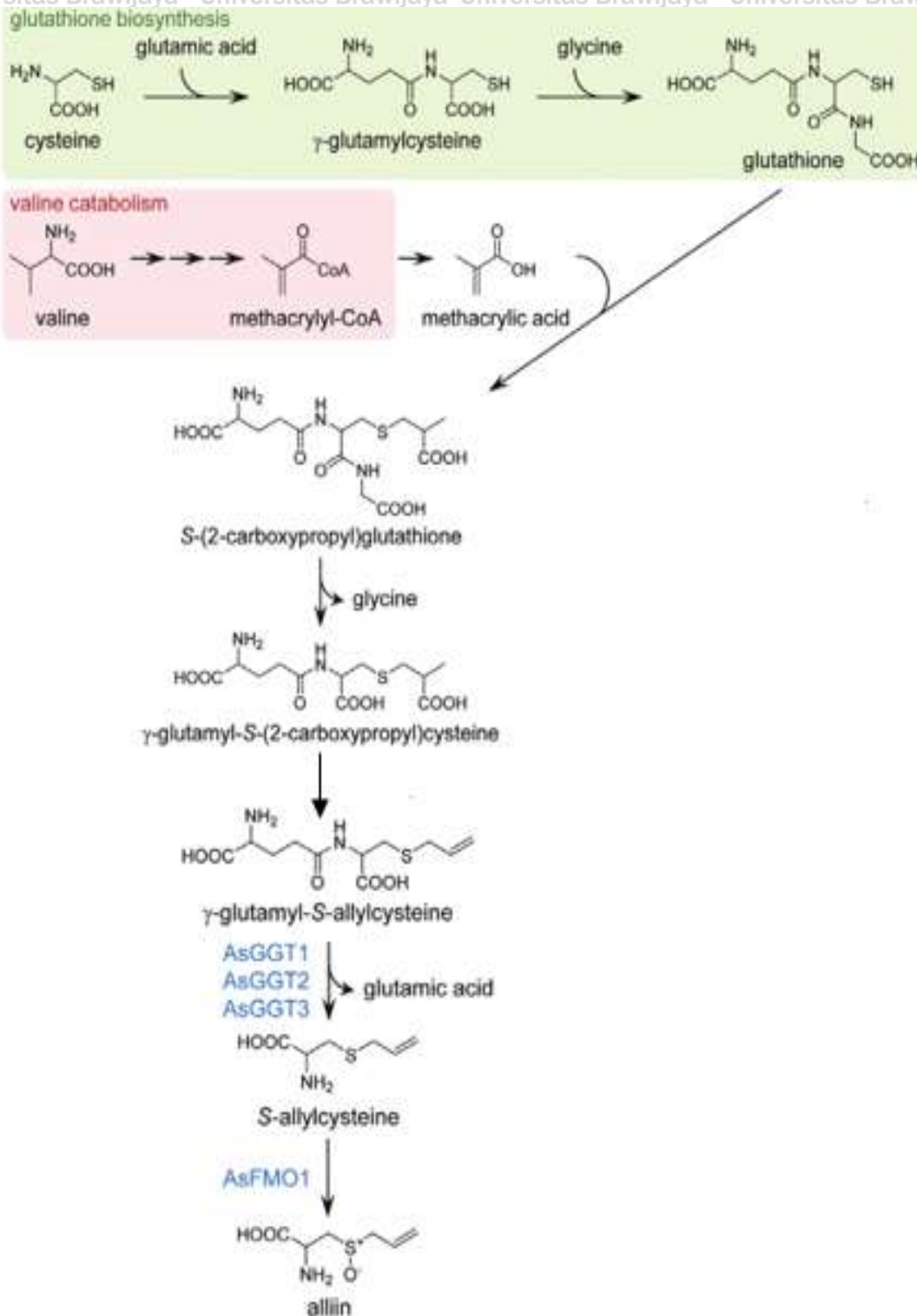
Pada awal jalur biosintesis alliin, glutathione berkonjugasi dengan asam metakrilat menghasilkan senyawa intermediet S-2-karboksi propil glutathione. Pelepasan gugus glikil dari S-2-karboksi propil glutathione akan menghasilkan γ -glutamil-S-2-karboksi propil sistein. Gugus S-2-karboksi propil diubah menjadi gugus S-2-propenil melalui dekarboksilasi oksidatif menjadi γ -glutamil S-2-propenil sistein atau γ -glutamil S-allil sistein. Pelepasan gugus γ -glutamil pada γ -glutamil S-allil sistein menjadi S-allil sistein kemungkinan dikatalisis oleh γ -glutamil transpeptidase (GGT) (EC 2.3.2.2). GGT tersebar luas pada organisme dan mengkatalisis transfer gugus γ -glutamil dari berbagai senyawa γ -glutamil ke molekul penerima seperti air, asam amino, dan rantai peptida pendek (Meister *et al.*, 1981). GGT mempunyai peran yang penting dalam degradasi glutathione (Grzam *et al.*, 2007; Martin *et al.*, 2007). Dalam dekade terakhir, telah diidentifikasi tiga gen dari bawang putih yang mengkode GGT, yaitu AsGGT1, AsGGT2, dan AsGGT3 (Cho *et al.*, 2012; Yoshimoto *et al.*, 2015). Protein rekombinan AsGGT1, AsGGT2, dan AsGGT3 menunjukkan adanya aktivitas dalam melepaskan gugus γ -glutamil dari γ -glutamil-S-allil sistein untuk menghasilkan S-allil sistein.

Pada bagian akhir, S-allil sistein diubah menjadi S-allil sistein sulfoksida atau alliin melalui S-oksidogenasi. Flavin mono-oxygenase (FMO) diprediksi bertanggung jawab atas reaksi S-oksidogenasi dengan adanya *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate* (NADPH) dan *flavin adenine dinucleotide* (FAD). Protein rekombinan AsFMO1 menunjukkan adanya aktivitas S-oksidogenasi terhadap S-allil sistein (Yoshimoto *et al.*, 2015).

Yamaguchi & Kumagai (2019) melaporkan bahwa proses alkenilasi secara langsung terhadap sistein akan menghasilkan S-allil-sistein. S-allil sistein selanjutnya mengalami S-oksidasi menghasilkan S-allil sistein sulfoksida atau alliin (Gambar 8). Dilaporkan juga bahwa thioalkilasi secara langsung terhadap serin akan menghasilkan S-allil sistein yang selanjutnya mengalami oksidasi menghasilkan S-allil-sistein sulfoksida (Jones 2007). Pembentukan senyawa organosulfur yang lain terjadi melalui reaksi hidrolisis alliin oleh enzim alliinase yang akan menghasilkan senyawa intermediat asam allil sulfenat. Reaksi kondensasi dari asam allil sulfenat akan menghasilkan allisin (Crozier *et al.*, 2006; Borlinghaus, 2014). Allisin merupakan senyawa golongan thiosulfinat yang tidak stabil, dan dengan cepat terdegradasi menjadi allil disulfida, ajoen (E-ajoen, Z-ajoen) dan dithiin (2 vinil 1,3 dithiin; 3 vinil 1,2 dithiin) serta senyawa sulphur yang lain (Arnault, 2001; Gruhlke, 2010).

2.4 Senyawa Bioaktif Organosulfur dan Manfaatnya Bagi Kesehatan

Senyawa organosulfur adalah senyawa yang mengandung atom belerang yang terikat pada gugus sianat atau gugus karbon dalam konfigurasi siklik ataupun non siklik. Tinjauan bioaktivitas senyawa yang mengandung sulfur yang merupakan karakteristik dari tanaman *Allium* telah banyak dilaporkan. Bawang putih dan komponen bioaktifnya menunjukkan banyak fungsi biologis, seperti aktivitas antioksidan, anti inflamasi, imunomodulator, pelindung kardiovaskular, antikanker, hepatoprotektif, pelindung sistem pencernaan, anti diabetes, anti obesitas, pelindung saraf, pelindung ginjal, antibakteri, dan antijamur (Pourzand *et al.*, 2016; Saljoughian *et al.*, 2017). Adanya fungsi biologis tersebut menjadikan senyawa yang mengandung sulfur yang diturunkan dari *Allium* banyak diterapkan pada berbagai terapi dalam bidang kesehatan dan pertanian (Yoshimoto & Saito, 2019). Senyawa organosulfur di dalam bawang putih tunggal mempunyai peranan penting dalam mengatasi berbagai gangguan kesehatan (Tabel 2).



Gambar 7. Biosintesis S-allyl sistein sulfoksida (alliin)

Sumber : Yoshimoto & Saito, 2019

Tabel. 2 Aktivitas biologis senyawa organosulfur

Senyawa organosulfur	Potensi biologis	Referensi
Alliin	Antihipertensi	Asdaq <i>et al.</i> , 2010
	Antikanker	Mansingh <i>et al.</i> , 2018
	Antioksidan	Parvu <i>et al.</i> , 2011
	Antimikroba	Rahman, 2007; Parvu <i>et al.</i> , 2011
	Antidiabet	Ohaeri, 2001; Banerjee, 2002
	Antiaterosklerosis	Mahmutovic <i>et al.</i> , 2014
	Antitrombotik	Ugwu, 2016
	Penghambatan hidrosil metyl glutaryl pada gangguan hati	Ugwu, 2016
	Memberikan efek peningkatan aktifitas fibrinolisis	Pizorno & Murray, 2001
Allisin	Antidiabet	Banerjee & Maulik, 2001
	Antioksidan	Schwartz <i>et al.</i> , 2002; Suddek, 2014
	Antiaterosklerosis	Mahmutovic <i>et al.</i> , 2014
	Antikanker	Mahmutovic <i>et al.</i> , 2014
	Antitrombotik	(Ugwu, 2016).
Allil sulfida	penghambatan sintesis kolesterol	Yeh & Liu, 2001; Ugwu, 2016
	Antikanker	Omar 2010; Mahmutovic <i>et al.</i> , 2014
	Antimikroba	Mahmutovic <i>et al.</i> , 2014
	Antiaterosklerosis	Mahmutovic <i>et al.</i> , 2014
Allil methyl sulfida	Proteksi terhadap jantung	Khatua <i>et al.</i> , 2017
Diallil trisulfida	Antikanker	Jiang <i>et al.</i> , 2017; Wei <i>et al.</i> , 2017
Diallil disulfida	Antikanker	Saud <i>et al.</i> , 2016
Dithiin	Antitrombotik	Jesse <i>et al.</i> 1997; Higuchi <i>et al.</i> , 2003
	Antimikroba	Higuchi <i>et al.</i> 2003
	Antioksidan	Higuchi <i>et al.</i> 2003
	Antiaterosklerosis	Mahmutovic <i>et al.</i> , 2014
	Antikanker	Mahmutovic <i>et al.</i> , 2014
Ajoen	Antitrombotik	Jesse <i>et al.</i> 1997; Srivastava, 1993
	Antimikroba	Haris <i>et al.</i> , 2001
	Antioksidan	Capasso, 2013; Boonpeng <i>et al.</i> , 2014
	Antiaterosklerosis	Mahmutovic <i>et al.</i> , 2014
	Antikanker	Jung <i>et al.</i> 2014
	Proteksi terhadap jantung	Rahman, 2007
S-allil-γ-glutamyl-sistein	Penghambatan sintesis kolesterol	Yeh & Liu 2001; Ugwu, 2016
	Antioksidan	Reeve <i>et al.</i> 1993
	Antikanker	Omar, 2010
S-I propenil sistein	Antihipertensi	Asdaq, 2010; Ugwu, 2016
	Antihipertensi	Kodera <i>et al.</i> , 2017

2.5 Pertumbuhan Kultur Suspensi Sel

Kultur suspensi sel merupakan sel yang tumbuh sebagai sel tunggal atau agregat sel yang tersuspensi dalam media cair. Kultur suspensi sel diperoleh dengan cara memindahkan kalus remah ke dalam medium cair yang dipertahankan dalam kondisi aerasi, agitasi, pencahayaan dan temperatur yang sesuai selama periode kultur dalam waktu tertentu. Pemindahan kalus dari medium padat ke medium cair menyebabkan sel-sel terpisah dari kalus,

terdispersi secara merata di dalam medium cair dan membentuk suspensi sel yang aktif tumbuh dengan laju pertumbuhan yang cepat. Kelebihan dari kultur suspensi antara lain kondisi kultur dapat dikontrol dan dimodifikasi untuk memperoleh pertumbuhan yang optimal walaupun di luar musim pertumbuhan. Pertumbuhan sel dapat diamati dengan menggunakan beberapa metode pengukuran selama fase pertumbuhan, seperti pengukuran berat basah sel (FW), berat kering sel (DW), viabilitas sel, dan *settled cell volume* (Puad, 2018).

Kultur suspensi sel dapat digunakan sebagai gambaran dalam memahami dinamika pertumbuhan sel tumbuhan. Pertumbuhan sel tumbuhan meliputi pertambahan jumlah, ukuran atau massa sel. Kurva sigmoid merupakan fungsi pertumbuhan yang mencirikan pola pertumbuhan tanaman sepanjang suatu generasi secara khas. Kurva ini terbentuk oleh variabel parameter pertumbuhan sel yang digambarkan terhadap waktu. Pertumbuhan tanaman pada mulanya lambat kemudian berangsur-angsur lebih cepat sampai tercapai titik maksimum akhirnya laju tumbuh menurun. Bentuk kurva sigmoid untuk semua tanaman pada umumnya tetap, tetapi adanya perbedaan dapat terjadi sebagai akibat faktor lingkungan. Dalam siklus pertumbuhan, pada umumnya sel akan mengalami empat fase yaitu fase lag, fase eksponensial, fase stasioner dan fase kematian (Puad, 2019). Fase lag merupakan fase adaptasi sel dengan media kultur, sel dalam medium kultur berada dalam tahap persiapan untuk membelah. Setelah sel menyesuaikan diri dengan media kultur sel selanjutnya sel memasuki fase pertumbuhan eksponensial. Fase ini ditandai dengan periode pertumbuhan sel dengan cepat hingga mencapai maksimum. Fase selanjutnya adalah fase stasioner, pada fase ini jumlah sel dalam kultur suspensi cenderung konstan karena sel-sel berhenti membelah. Siklus pertumbuhan dapat terulang apabila pada awal fase stasioner, sel disubkultur pada medium cair baru. Setelah mencapai fase stasioner pertumbuhan sel akan menurun dan memasuki fase kematian, hal ini menunjukkan adanya sejumlah sel yang mengalami lisis.

Kultur suspensi sel *Bletilla striata* Rchb.f. mempunyai 6 fase pertumbuhan, yaitu fase lag, fase eksponensial, fase linier, fase perlambatan, fase stasioner, fase kematian. Pertumbuhan maksimum dari suspensi sel *Bletilla striata* Rchb.f. tercapai pada akhir fase linier atau pada awal fase stasioner. Senyawa *p*-hidroksibenzyl alcohol, *dactylorhin A*, *militarine* dan *coelonin* dalam kultur suspensi sel *Bletilla striata* Rchb.f. terakumulasi pada fase yang berbeda. Senyawa *coelonin* terakumulasi maksimum pada fase eksponensial, sedangkan *dactylorhin A* dan *militarine* terakumulasi maksimum pada akhir fase eksponensial.

Senyawa p-hidroksibenzil alkohol terakumulasi pada akhir fase linier dan maksimum pada fase stasioner (Pan, 2020).

2.6 Potensi Kultur Suspensi Sel untuk Produksi Senyawa Bioaktif Tanaman

Kultur in vitro adalah suatu metode untuk mengisolasi bagian-bagian tanaman seperti sel serta menumbuhkannya secara aseptis di dalam suatu medium dalam kondisi lingkungan yang terkontrol (Murthy, 2014). Kondisi-kondisi yang terkontrol, seperti suplai nutrisi yang tepat, pH medium dan suhu yang sesuai, akan menjaga kultur tetap kondusif untuk pertumbuhan dan perkembangannya (Hussain, 2012).

Kultur sel dan kultur organ tanaman dapat dijadikan sebagai sumber untuk memperoleh metabolit sekunder yang potensial, yang digunakan secara luas dalam bidang farmasi, agrokimia, flavors, bahan pewarna, biopestisida, dan zat aditif pada makanan (Murthy, 2014). Dalam bidang farmasi kultur sel tanaman dijadikan sumber yang potensial untuk mendapatkan senyawa bioaktif yang bernilai tinggi (Bathia *et al.*, 2016) karena banyak spesies tanaman mampu memproduksi senyawa bioaktif yang berperan penting dalam menjaga kesehatan manusia, tetapi karena beberapa hal seperti adanya perubahan musim, kondisi lingkungan, umur tanaman, kesulitan dalam penyebaran spesies tertentu menyebabkan ketersediaan senyawa bioaktif menjadi terbatas (Castro *et al.*, 2016). Sel, jaringan, atau organ yang dikultur secara in vitro dengan kondisi yang optimal, dapat mendorong produksi senyawa bioaktif dalam waktu yang lebih singkat dari pada saat ditanam pada habitat aslinya, selain itu rendemen produk yang diinginkan dapat meningkat.

Senyawa bioaktif yang diproduksi secara kultur in vitro memberikan beberapa keuntungan antara lain pasokan produk tidak bergantung pada ketersediaan tanaman, pertumbuhan sel atau jaringan dapat diperoleh dengan kondisi yang terkontrol dan optimal, tidak memerlukan pemakaian bahan-bahan yang berbahaya (mis: insektisida dan herbisida), suplementasi substrat alami kemungkinan dapat meningkatkan produksi senyawa sintetik baru, tidak tergantung pada iklim dan letak geografis (Bathia *et al.*, 2016). Beberapa kultur sel tanaman yang telah dilaporkan dapat menghasilkan senyawa bioaktif yang lebih tinggi dibandingkan tanaman utuh (Tabel 3).

Tabel 3. Senyawa bioaktif dengan rendemen tinggi hasil dari kultur sel tanaman

Produk	Spesies tanaman	Rendemen (%DW)
Shikonin	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	12,4
Serpentin	<i>Catharanthus roseus</i>	2,2
Sanguinarin	<i>Papaver somniferum</i>	2,5
Asam rosmarinat	<i>Salvia officinalis</i>	36
Jatrorrhizin	<i>Berberis wilsoniae</i>	10
Diosgenin	<i>Dioscorea deltoidea</i>	3,8
Berberin	<i>Thalictrum minus</i>	10,6
Berberin	<i>Coptis japonica</i>	7,5
Antraquinon	<i>Morinda citrifolia</i>	18
Antosianin	<i>Perilla frutescens</i>	8,9

Sumber : Bathia *et al.*, 2016

Beberapa penelitian telah dilakukan dalam memproduksi senyawa bioaktif melalui kultur suspensi sel tanaman (Tabel 4). Kemajuan di bidang kultur sel telah memungkinkan untuk memproduksi berbagai macam obat-obatan seperti alkaloid, terpenoid, steroid, saponin, fenolat, flavanoids dan asam amino (Vijayasree *et al.*, 2010). Keuntungan utama dari kultur suspensi sel yang mampu menyediakan sumber tanaman obat secara terus-menerus, dapat digunakan untuk memproduksi senyawa bioaktif dalam skala industri (Tabel 5). Aplikasi secara komersial yang pertama dilakukan melalui kultur suspensi sel skala besar adalah shikonin pada kultur suspensi sel kultur sel *Lithospermum erythrorhizon* (Paine, 1987) dan berberin pada kultur sel *Coptis japonica* (Fujita, 1998).

Tabel 4. Produksi Senyawa Bioaktif Tanaman Melalui Kultur Suspensi Sel

Senyawa bioaktif	Fungsi biologis	Spesies Tanaman	Ref.
Dipiranocoumarin	Anti-HIV	<i>Callopylum inophyllum</i>	Pawar & Thengane, 2009
Ginkgolides	Tonik kesehatan	<i>Ginkgo biloba</i>	Kang <i>et al.</i> , 2009
Sanguinarin	Anti-karang gigi	<i>Papaver somniferum</i>	Holkova <i>et al.</i> , 2010
Taxol	Anti-kanker	<i>Taxus baccata</i>	Malik <i>et al.</i> , 2011
Antraquinon	Anti-mikroba	<i>Rubia tinctorum</i>	Perassolo <i>et al.</i> , 2011
Asam ginnemat	Anti-diabetes	<i>Gymnema sylvestre</i>	Praveen <i>et al.</i> , 2011
Inulin	Anti-diabetes	<i>Heliantus tuberosus</i>	Taha <i>et al.</i> , 2012
Fenolik	Anti-rematik	<i>Larrea divaricata</i>	Palacio <i>et al.</i> , 2012
Polifenol, catekin	Anti-kanker	<i>Camellia sinensis</i>	Muthaiya <i>et al.</i> , 2013
Shikonin	Anti-mikroba	<i>Arnebia sp.</i>	Gupta <i>et al.</i> , 2014
Fenolik	Anti-oksidan	<i>Artemisia absinthium</i>	Ali & Abassi, 2014
Mulberrosida	Anti-inflamasi	<i>Morus alba L.</i>	Komaikul <i>et al.</i> , 2015
Flavonoid	Anti-oksidan	<i>H. perforatum</i>	Yao, 2015
Senyawa fenolik	Anti-oksidan	<i>Phoenix dactylifera</i>	Naik & Al-Khayri, 2017
Asam fenolik	Anti-inflamasi	<i>Salvia leriifolia Benth.</i>	Modarres <i>et al.</i> , 2018
Squalan	Analgesik		
Squalan	Anti-kanker	<i>Santalum album L.</i>	Rani <i>et al.</i> , 2018
Stilbenoid	Anti-obesitas	<i>Morus alba L.</i>	Inyai <i>et al.</i> , 2018
Parthenolide	Anti-inflamasi	<i>Tanacetum parthenium</i>	Pourianezhad <i>et al.</i> , 2019
	Anti-kanker		

Tabel 5. Produksi Senyawa Bioaktif Tanaman Skala Komersial

Senyawa bioaktif	Spesies Tanaman	Produsen
Berberin	<i>Coptis japonica</i> <i>Thalictrum minus</i>	Mitsui Chemicals, Inc
Echinacea polisakarida	<i>Echinacea purpurea</i> <i>Echinacea angustifolia</i>	Diversa, Ahrensburg, Germany
Paclitaxel	<i>Taxus spp</i>	Phyton Biotech., Inc Germany Samyang Genex., Seoul, Korea Selatan
Podopilotoksin	<i>Podophyllum spp.</i>	Nippon Oil, Tokio, Jepang
Asam rosmarinat	<i>Coleus blumei</i>	ANattermann & Cie. Gmbh, Cologne, Jerman
Skopolamin	<i>Duboisia spp.</i>	Sumitomo Chemical Co., Ltd, Tokio, Jepang
Geraniol	<i>Geraminea spp.</i>	Mitsui chemicals., Inc
Gingseng	<i>Panax ginseng</i>	Nitto Denko Corporation, Osaka, Jepang
Shikonin	<i>Lithospemum erythrorhizon</i>	Mitsui Chemicals., Inc
Antosianin	<i>Euphorbio milii</i> <i>Aralia cordata</i>	Nippon Paint Co. Ltd, Osaka Jepang
Betasianin	<i>Beta vulgaris</i>	Nippon Shinyaku Co., Ltd
Cartamin	<i>Carthamus trinctorius</i>	Kibun Foods Inc., Tokio Jepang

Sumber: Ochoa-Villarrea *et al.*, 2016

2.7 Strategi Peningkatan Produksi Senyawa Bioaktif Pada Kultur Sel : Pemberian Elisitor dan Prekursor

Optimalisasi media kultur untuk meningkatkan produktivitas tanaman, sel, jaringan atau organ diharapkan dapat mencapai produktivitas maksimum dalam meningkatkan biomassa dan produksi senyawa bioaktif dalam kultur *in vitro*. Media kultur yang dapat meningkatkan biomassa belum tentu dapat meningkatkan produksi senyawa bioaktif. Dilaporkan Figueiro *et al.* (2010), kultur pucuk *Hypericum perforatum* menghasilkan biomassa yang rendah dan produksi hypericin yang juga rendah pada umur kultur 20-30 hari, namun pada tahap kultur selanjutnya dapat dihasilkan hypericin lebih tinggi. Frekuensi penggojokan terhadap media kultur memberikan sedikit pengaruh terhadap pertumbuhan biomassa dan produksi senyawa bioaktif. Mengoptimalkan parameter pertumbuhan kultur merupakan hal penting untuk meningkatkan produksi biomassa dan senyawa bioaktif dalam kultur *in vitro* (Vasilev *et al.*, 2014). Produksi sebagian besar senyawa bioaktif tidak terkait dengan pertumbuhan sel, tetapi produksi senyawa bioaktif terjadi lebih banyak selama akhir siklus pertumbuhan (Dixon, 2010). Pertumbuhan biomassa dan produksi senyawa bioaktif pada kultur sel dapat ditingkatkan menggunakan media yang kaya akan nutrisi disertai dengan penambahan elisitor dan prekursor (Malik *et al.*, 2013; Murty, 2014).

2.7.1 Elisitasi (pemberian elisitor)

Metabolit sekunder atau senyawa bioaktif pada tanaman diproduksi oleh sel tanaman sebagai respon pertahanan terhadap gangguan lingkungan selama pertumbuhannya. Dalam kondisi tertentu, kultur sel dapat menghasilkan senyawa bioaktif dalam periode waktu yang lama dibandingkan dengan yang ditemukan pada tanaman induk. Strategi yang dilakukan seperti manipulasi pada media, kondisi kultur, dan konsentrasi hormon seringkali tetap kurang bisa memenuhi kebutuhan pasar. Senyawa yang memicu respon pertahanan yang diaplikasikan pada kultur sel, jaringan atau organ tanaman dapat digunakan sebagai alternatif untuk meningkatkan produktivitas senyawa bioaktif dalam kultur *in vitro* (Zhao *et al.* 2005). Pemberian elisitor atau elisitasi pada kultur *in vitro* merupakan strategi yang efektif untuk bisa meningkatkan produksi senyawa bioaktif (Karuppusamy, 2009; Giri dan Zaheer, 2016; Ramirez-Estrada *et al.*, 2016).

Elisitor adalah senyawa atau zat yang ketika diintroduksi dalam konsentrasi kecil pada sistem sel hidup, dapat meningkatkan biosintesis senyawa tertentu (Radman, 2003) atau senyawa yang dianggap sebagai molekul yang mengaktifkan sinyal transduksi dan menyebabkan aktivasi dan ekspresi gen yang terkait dengan biosintesis senyawa metabolit sekunder (Zhao *et al.*, 2005). Elisitor dapat diklasifikasikan berdasarkan sifat dan asal elisitor (Tabel 6). Berdasarkan sifatnya, yaitu elisitor biotik dan elisitor abiotik. Elisitor yang berasal dari komponen hayati, disebut elisitor biotik yang meliputi elisitor yang dihasilkan secara langsung oleh mikroorganisme, terbentuk dari aktivitas mikroorganisme pada dinding sel tanaman, terbentuk dari aktivitas enzim tanaman dan senyawa yang dihasilkan oleh sel tanaman sebagai respon terhadap beberapa rangsangan.

Elisitor abiotik merupakan substansi yang berasal dari zat non biologis (mis., penyinaran, logam berat, senyawa kimia). Menurut asalnya elisitor dikelompokkan dalam elisitor eksogen dan elisitor endogen. Elisitor eksogen merupakan elisitor yang diberikan atau berasal dari luar sel (mis: polisakarida, peptida dan asam lemak), sedangkan elisitor endogen merupakan elisitor yang dihasilkan dari reaksi sekunder dalam sel yang diinduksi oleh signal elisitor biotik atau abiotik. Beberapa parameter, seperti jenis dan konsentrasi elisitor, lama paparan, jadwal perawatan, jenis kultur, umur kultur, komposisi nutrisi media kultur, dan usia atau tahap kultur pada saat pemberian elisitor merupakan faktor utama yang dapat menentukan

efektivitas strategi elisitasi terhadap biomassa dan produksi senyawa bioaktif (Murthy, 2014; Naik, 2016; Dhiman, 2018).

Tabel.6. Klasifikasi Elisitor

A) Sifat Elisitor	
Elisitor Biotik	Elisitor Abiotik
<ul style="list-style-type: none"> - Komposisi diketahui mis: chitin, chitosan, glikoprotein, pectin, alginat, xanthan, elicitin, dll - Komposisi tidak diketahui mis: ekstrak yeast, homogenat fungi, ekstrak bakteri, dll 	<ul style="list-style-type: none"> - Kimiawi <ul style="list-style-type: none"> - Logam berat - Tekanan osmotik - Substansi gas - Fisika <ul style="list-style-type: none"> - Radiasi UV - Penyinaran - Salinitas - Kekeringan - Molekul pensinyalan <ul style="list-style-type: none"> - Asam jasmonat - Metil jasmonat - Asam salisilat - Asam acetil salisilat
B) Asal Elisitor	
Elisitor Eksogen	Elisitor Endogen
<ul style="list-style-type: none"> - Polisakarida (mis; glukomanan, glukukan, kitosan) - Peptida (mis; poly-L-lysin, poliamina, glikoprotein) - Enzim (mis; selulase, poligalakturonase, asam endopoligalakturonat lyase) - Asam lemak (mis; asam arakidonat, asam eikosapentanoat) 	<ul style="list-style-type: none"> - Asam jasmonat - Metil jasmonat - Asam salisilat - Asam acetil salisilat

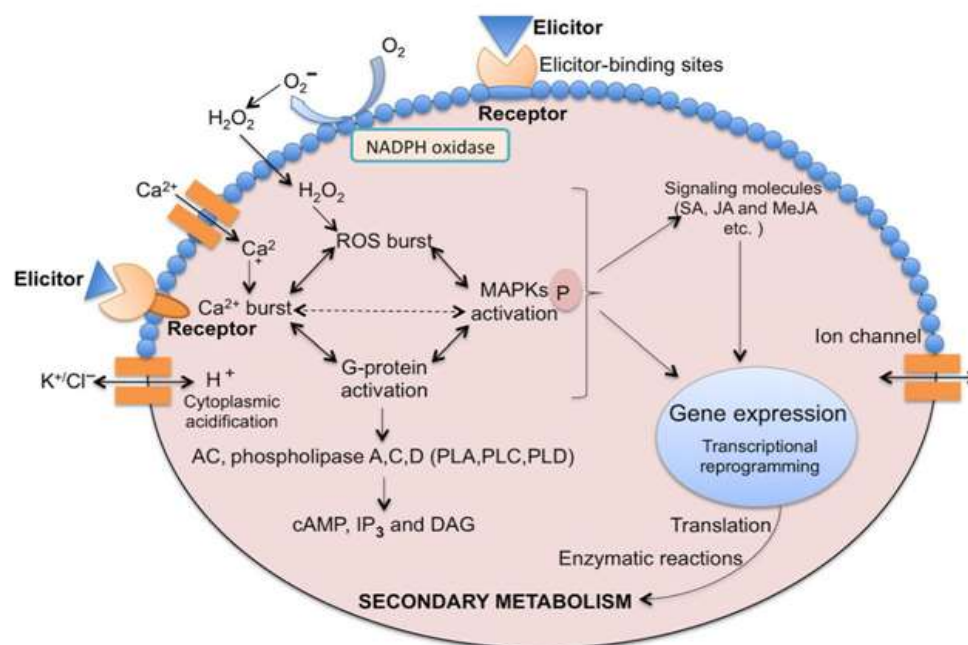
Sumber : Namdeo, 2007; Halder, 2019

2.7.1.1 Mekanisme elisitasi dalam meningkatkan senyawa bioaktif

Tanaman mempunyai kemampuan untuk mempertahankan diri dari segala ancaman yang ditimbulkan oleh lingkungan, seperti serangan patogen, kekeringan, salinitas, paparan radiasi UV, dll. Tanaman dapat merasakan adanya sinyal ancaman melalui reseptor dan sensor, selanjutnya tanaman akan mengaktifkan respon pertahanan (Osakabe *et al.*, 2013). Respon tersebut adalah diproduksinya metabolisme sekunder dan senyawa ini memiliki sifat farmakologis yang penting (Gonzalez-Lamonthe *et al.*, 2009). Kemampuan tanaman dalam melawan tekanan biotik dan abiotik melalui mobilisasi metabolit sekunder merupakan dogma sentral dari elisitasi.

Pengenalan elisitor oleh reseptor yang terikat pada membran plasma, dapat menstimulasi terjadinya fluks ion, pengasaman sitoplasma, peningkatan Ca^{2+} , peningkatan *Reactive oxygen species* (ROS), aktivasi NADPH oksidase, aktivasi G-protein, dan fosforilasi MAPK

(mitogen-activated protein kinase). Terjadinya pertukaran ion merupakan respon awal pada tanaman, misalnya keluarnya ion K^+/Cl^- dan masuknya ion Ca^{2+}/H^+ . Masuknya Ca^{2+} dianggap sebagai peristiwa yang paling penting karena keterlibatannya yang beragam dalam proses fisiologis dan seluler (White *et al.*, 2003). Sinyal Ca^{2+} dihasilkan dengan perubahan konformasi pada beberapa Ca^{2+} yang berikatan dengan protein, seperti calmodulin, calmodulin-like protein, *calcium-dependent kinase* (CDPKs) dan fosfolipase, melalui second messengers seperti inositol 1,4,5-trifosfat (IP_3) dan diasilgliserol (DAG) (Meijer, 2003; Wang, 2002; Bigeard, 2015). Jalur yang dimediasi oleh Ca^{2+} /Calmodulin terlibat dalam banyak respons fisiologis tanaman terhadap rangsangan. CDPKs memiliki peran yang beragam dalam kasus pensinyalan hilir dan fosforilasi protein dalam mengatur proses seluler seperti regulasi ledakan oksidatif, pensinyalan hormon dan ekspresi gen (Bousdocq, 2013). ROS adalah fenomena penting lainnya dalam respons pertahanan tanaman, sebagai efek dari NADPH oksidase atau oksidase lain dalam sel tanaman, dan terjadinya penumpukan Ca^{2+} juga menyebabkan pembentukan ROS (White, 2003; Zhao, 2001). Aktivasi dari G-protein dapat merangsang peningkatan cAMP, IP_3 dan DAG, yang memicu target kinase PKA dan PKC. Protein kinase yang diinduksi menyebabkan fosforilasi MAPK, yang selanjutnya menghasilkan ekspresi gen yang mengarah aktivasi gen-gen yang berperan dalam reaksi enzimatik pada jalur biosintesis metabolit sekunder (Vasconsuelo *et al.*, 2007). (Gambar 8).



Gambar 8. Mekanisme elisitasi
Sumber: Shakya *et al.*, 2017

2.7.1.2 Elisitor logam

Beberapa jenis logam seperti Ni, Ag, Co, Fe dan Zn telah terbukti dapat meningkatkan produksi senyawa bioaktif pada beberapa tanaman (Wang & Wu, 2013). Logam sebagai elisitor berperan dengan mengubah aspek dari metabolisme sekunder (Karuppusamy, 2009). Elisitor logam akan ditangkap oleh reseptor membentuk kompleks logam-reseptor yang akan menyebabkan terjadinya proses penyampaian pesan (sinyal transduksi). Terjadinya sinyal transduksi akan mengaktifkan gen-gen untuk faktor transkripsi. Gen-gen faktor transkripsi akan mengaktifkan gen-gen untuk enzim-enzim yang berperan dalam jalur biosintesis senyawa bioaktif.

Beberapa hasil penelitian penggunaan elisitor yang mampu meningkatkan produksi senyawa bioaktif pada kultur sel antara lain; elisitasi 8 μM logam Zn^{2+} mampu meningkatkan senyawa bioaktif sulforaphane 3x lipat kontrol pada kultur kalus *Lepidium draba* (Mohammadi et al., 2014), elisitasi logam Zn^{2+} 0,2 mM mampu mengakumulasi senyawa xanthotoxin 2x lipat kontrol pada kultur kalus *Ammi majus* (Katara et al., 2014). Penggunaan beberapa jenis logam yang digunakan sebagai elisitor pada kultur suspensi sel untuk meningkatkan senyawa bioaktif tanaman juga banyak dilaporkan (Tabel 7).

Tabel 7. Penggunaan Elisitor Abiotik (Logam) Untuk Peningkatan Produksi Senyawa Bioaktif Pada Kultur Sel Tanaman

Elisitor	Kons.	Senyawa bioaktif	Spesies Tanaman	Peningkatan dibandingkan kontrol	Ref.
La^{3+}	5,8 μM	Taxol	<i>Taxus spp</i>	3 x	Wu et al., 2001
Ce^{3+}	40 μM	Crocin	<i>Crocus sativus L</i>	3 x	Chen et al., 2004
Cd^{2+}	0,4 mM	Ajmalisin	<i>Catharanthus roseus</i>	4 x	Zheng, 2004
Zn^{2+}	0,2 mM	Quercetin	<i>Plucea lanceolata</i>	2x	Kumar et al., 2004
Cu^{2+}	75 μM	Diosgenin	<i>Dioscorea bulbifera</i>	8 x	Narula et al., 2005
Ag^{+}	1 mM	Silymarin	<i>Silybum marianum</i>	2 x	Ashtiani, 2010
Zn^{2+}	0,24 mM	Red pigmen	<i>Chartamus tinctorius</i>	7x	Chavan, 2010
Cu^{2+}	0,5 mM	Inophyllum	<i>Calophyllum L</i>	30 x	Pawar et al., 2011
Cu^{2+}	0,5 mM	Prolin	<i>Withania somnifera</i>	2 x	Fatima et al., 2011
Zn^{2+}	0,2 mM	Prolin	<i>Withania somnifera</i>	2 x	Fatima et al., 2011
Zn^{2+}	0,3 mM	Tot. Klorofil	<i>Withania somnifera</i>	2,3 x	Fatima et al., 2011
Fe^{3+}	0,3 mM	Red pigmen	<i>Chartamus tinctorius</i>	8x	Chavan, 2010
Fe^{3+}	0,3 mM	Yellow pigmen	<i>Chartamus tinctorius</i>	20x	Chavan, 2010
Fe^{3+}	0,1mM	Betalain	<i>Baugenvillea</i>	2x	Lachotia et al, 2014

2.7.2 Pemberian prekursor (*precursor feeding*)

Strategi lain yang digunakan untuk meningkatkan senyawa metabolit sekunder pada kultur sel adalah pemberian prekursor (Tabel 8). Pemberian prekursor didasarkan pada prinsip bahwa beberapa senyawa intermediate atau yang menjadi substrat pada jalur biosintesis senyawa bioaktif dapat digunakan untuk meningkatkan produk akhir (Ramachandra dan Ravishankar, 2002). Strategi pemberian prekursor terbukti efektif dalam meningkatkan produksi metabolit sekunder di bidang farmasi dalam kultur in vitro sel tanaman (Namdeo *et al.*, 2007). Beberapa parameter, seperti jenis dan konsentrasi prekursor, lama pemberian prekursor merupakan faktor utama dalam penggunaan prekursor untuk meningkatkan senyawa bioaktif yang ditargetkan (Jackson & Attalla 2010).

Beberapa hasil penelitian penggunaan prekursor yang mampu meningkatkan produksi senyawa bioaktif pada kultur sel tanaman antara lain: triptopan 1 mM meningkatkan produksi alkaloid pada kultur kalus mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* [Scheff.]Boerl.) (Gusni *et al.*, 2015), triptopan 0,7 mM meningkatkan produksi thymol dan prolin 1,3 mM meningkatkan produksi coumarin pada kultur kalus *Verbascum thapsus* L (Al-Jibouri *et al.*, 2016), L-fenilalanin 0,1 mM meningkatkan produksi scopoletin pada kultur sel *Spilanthes acmella* Murr (Abyari *et al.*, 2016).

Tabel 8. Penggunaan Prekursor Untuk Peningkatan Produksi Senyawa Bioaktif Pada Kultur Suspensi Sel Tanaman

Prekursor	Kons.	Senyawa bioaktif	Spesies Tanaman	Peningkatan dibandingkan kontrol	Ref.
Phenilalanin	15 mg/L	Paclitaxel	<i>Taxus chinensis</i>	3 x	Luo & He, 2004
Phenilalanin	0,2 mM	Phenylethanoid	<i>Cistanche deserticola</i>	1,5 x	Ouyang <i>et al.</i> , 2005
cis-Farnesol	100 mg/L	Patchouli Alkohol	<i>Pogostemon cablin</i>	1,3 x	Bunrathep <i>et al.</i> , 2006
L-Tirosin	200 mg/L	Phenylethanoid	<i>Cistanche deserticola</i>	1,5 x	Liu <i>et al.</i> , 2007
Phenylalanin	5 mg/L	Antosianin	<i>Vitis vinifera</i>	4,6 x	Qu <i>et al.</i> , 2011
M.Jasmonate	50 mg/L				
Chitosan	100 mg/L	Withanolides	<i>Withania somnifera</i> L	2,5 x	Sivanandhan <i>et al.</i> , 2014
L-Tirosin	1 mM	Thebaine	<i>Papaver bracteatum</i>	22,6 x	Zare <i>et al.</i> , 2014
2,6-dimetil-cyclodextrin	50 mM	Lutein	<i>Artemisia annua</i> L	10 x	Rizzello <i>et al.</i> , 2014
Asam ferulat	1 mM	Vanillin	<i>Decalepis hamiltonii</i>	3 x	Matam <i>et al.</i> , 2017

2.8 Kerangka Konsep Penelitian

Bawang putih (*Allium sativum* L) tunggal adalah salah satu tanaman herbal yang manfaatnya bagi kesehatan menempati urutan tertinggi, hal ini disebabkan karena banyak sekali kandungan senyawa bioaktif yang ada di dalam umbi bawang putih tunggal. Sebagian besar senyawa bioaktif tersebut adalah golongan senyawa organosulfur, suatu senyawa bertanggungjawab terhadap aktivitas biologi dan fungsinya dalam bidang kesehatan, antara lain sebagai agen anti-diabetes, anti-hipertensi, anti-kolesterol, anti-atheroskeloris, anti-oksidan, anti-virus, anti-mikrobia, dan anti-kanker. Beberapa komponen senyawa organosulfur yang bermanfaat sebagai bahan obat antara lain alliin, allisin, kelompok allil disulfida, dithiin dan ajoen (Gambar 9).

Adanya manfaat penting dari kandungan senyawa bioaktif organosulfur pada bawang putih tunggal menyebabkan permintaan konsumen akan bawang putih tunggal terus meningkat hingga 20-30% per tahun (Utami & Mardiana, 2014), namun demikian kebutuhan tersebut tidak didukung dengan ketersediaan bawang putih tunggal yang memadai. Ketersediaan bawang putih tunggal sulit diperoleh, karena dari 1 ton hasil panen bawang putih hanya bisa didapatkan 5-6 kg bawang putih tunggal. Kondisi tersebut menyebabkan diperlukannya suatu upaya untuk meningkatkan senyawa bioaktif organosulfur dalam bawang putih tunggal dengan metode alternatif.

Metode kultur sel merupakan metode alternatif yang dapat digunakan untuk memproduksi metabolit sekunder atau senyawa bioaktif tanaman. Kelebihan dari kultur sel adalah dapat menghasilkan senyawa bioaktif yang lebih konsisten dan dalam waktu lebih singkat serta kondisi lingkungan yang dapat diatur dan dikendalikan. Beberapa tipe kultur sel yang dapat digunakan untuk meningkatkan senyawa bioaktif tanaman antara lain kultur sel kalus, kultur suspensi sel dan kultur akar rambut.

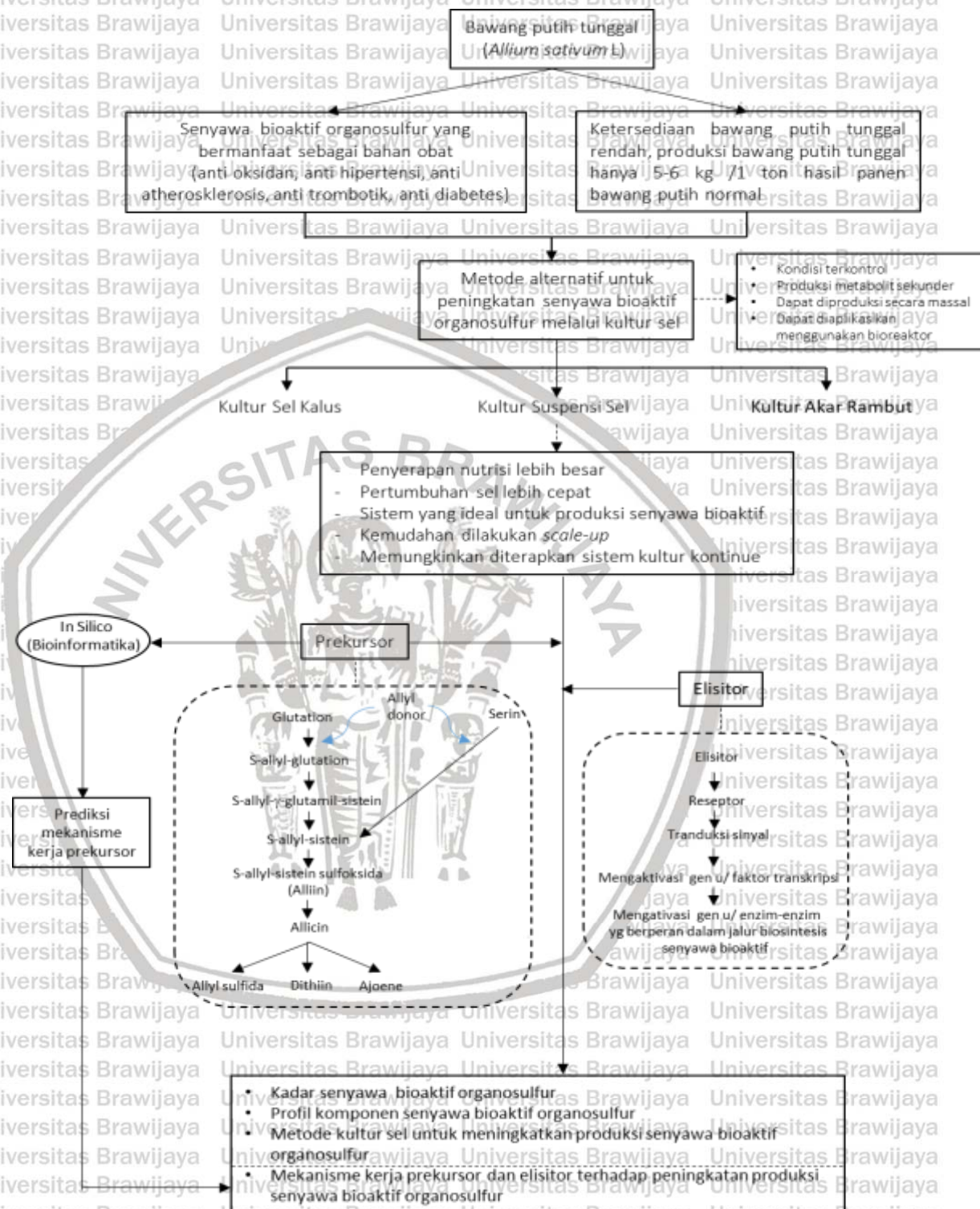
Kultur suspensi sel merupakan salah tipe kultur sel yang banyak digunakan dalam memproduksi senyawa bioaktif tanaman karena mempunyai beberapa kelebihan dibandingkan dengan beberapa tipe yang lain. Kelebihan dari kultur suspensi sel ini adalah penggunaan medium cair yang diinkubasi dengan penggojokan akan menyebabkan seluruh permukaan sel dapat kontak langsung dengan medium nutrisi dan terjadi proses aerasi yang lebih baik, sehingga terbentuk suspensi sel yang aktif tumbuh dengan laju pertumbuhan yang cepat.

Selain itu dapat digunakan untuk memproduksi senyawa bioaktif dalam skala besar (*scale up*) dan dalam waktu yang singkat dengan menggunakan bioreaktor.

Strategi yang dapat diterapkan untuk meningkatkan produksi senyawa bioaktif pada tanaman melalui teknik kultur suspensi sel antara lain adalah pemberian prekursor dan elisitor.

Glutation dan sistein merupakan senyawa yang terlibat dalam biosintesis pembentukan senyawa organosulfur. Glutation merupakan senyawa pemula dalam serangkaian proses biosintesis komponen senyawa organosulfur, sedangkan sistein merupakan asam amino penting yang merupakan senyawa intermediet pembentukan senyawa organosulfur, sehingga glutathione dan sistein dapat berperan sebagai prekursor. Elisitor adalah senyawa yang mampu menginduksi pembentukan senyawa tertentu sebagai respon pertahanan tanaman. Penambahan elisitor garam logam FeCl_3 dan ZnSO_4 pada medium kultur suspensi sel bawang putih tunggal, akan menginduksi terjadinya stres atau gangguan yang dapat mengubah keseimbangan reaksi dan biokimia pada tanaman sehingga diharapkan mampu meningkatkan akumulasi senyawa bioaktif organosulfur. Dengan menggunakan pendekatan in silico akan diprediksi mekanisme kerja dari prekursor dan elisitor sehingga mekanisme kerja prekursor dan elisitor dalam meningkatkan produksi senyawa bioaktif tanaman dapat diketahui.

Hasil akhir yang diharapkan dari penelitian ini antara lain akan didapatkan kadar dan profil komponen senyawa organosulfur, mekanisme kerja elisitasi dan mekanisme kerja prekursor dalam meningkatkan senyawa bioaktif organosulfur dengan pendekatan in silico, serta metode kultur sel yang dapat meningkatkan produksi senyawa bioaktif organosulfur pada bawang putih tunggal.



Gambar 9. Kerangka Konsep Penelitian

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan selama \pm 36 bulan, dimulai dari bulan Januari 2018 sampai Juli 2021. Tiga sampai empat bulan pertama digunakan untuk mendapatkan bawang putih tunggal varietas Tawangmangu Baru yang berasal dari Magetan Jawa Tengah. Penelitian di laboratorium meliputi induksi kalus, multiplikasi kalus, inisiasi suspensi sel, multiplikasi suspensi sel, perlakuan elisitor dan prekursor, serta evaluasi pertumbuhan sel dilakukan selama 12 bulan di Laboratorium Kultur Jaringan Tumbuhan jurusan Biologi Universitas Negeri Malang. Ekstraksi dan analisis senyawa organosulfur dilakukan selama 6 bulan. Penulisan proposal dan 3 buah artikel publikasi dilakukan selama 20 bulan.

3.2 Kerangka Operasional

Penelitian yang dilakukan terdiri dari penelitian *wet lab* dan *dry lab*. Tahapan penelitian kuantitatif atau eksperimen di laboratorium meliputi induksi dan multiplikasi kalus, inisiasi dan multiplikasi suspensi sel, perlakuan pemberian elisitor (elisitasi) dan pemberian prekursor (prekursor feeding), evaluasi pertumbuhan sel, serta analisis senyawa organosulfur. Penelitian kualitatif dilakukan dengan menggunakan beberapa software dan *web server* dari program komputasi untuk memprediksi potensi elisitor dan prekursor dengan cara melakukan proses molekular docking (Gambar 10).

3.2.1 Penelitian Kuantitatif (*wet lab*)

Penelitian kuantitatif merupakan penelitian eksperimental yang dilakukan di laboratorium (*wet lab*). Tahapan penelitian yang dilakukan meliputi induksi dan multiplikasi kalus, inisiasi dan multiplikasi kultur suspensi sel, perlakuan pemberian elisitor (elisitasi), perlakuan pemberian prekursor (*prekursor feeding*) pada kultur suspensi sel dan evaluasi terhadap sel (pertumbuhan biomassa, kadar dan profil komponen senyawa organosulfur). Evaluasi terhadap pertumbuhan biomassa sel meliputi pengukuran berat basah, berat kering, indeks pertumbuhan dan SCV.

Induksi kalus dilakukan terhadap eksplan tunas bawang putih tunggal (*Allium sativum* L) varietas Tawangmangu Baru yang berasal dari Magelang – Jawa Tengah. Tiga jenis perlakuan bagian eksplan, yaitu *crown*, tunas bagian tengah dan tunas bagian ujung bertujuan untuk memperoleh kalus yang dihasilkan dari bagian eksplan yang dapat memberikan respon pertumbuhan kalus terbaik. Medium yang digunakan adalah medium MS dengan penambahan zat pengatur tumbuh 0,3 ppm 2,4-D dan 0,5 ppm kinetin. Pada kalus yang dihasilkan, selanjutnya dilakukan multiplikasi dengan tujuan untuk memperoleh kalus dalam jumlah banyak dengan cara melakukan sub kultur. Inisiasi kultur suspensi sel dilakukan pada kalus yang telah diperoleh dengan tujuan untuk mendapatkan suspensi sel. Multiplikasi suspensi sel dilakukan untuk perbanyakan suspensi sel yang digunakan untuk perlakuan elisitasi dan *precursor feeding*. Perlakuan lama pemberian prekursor dan elisitor pada medium suspensi sel dilakukan selama 2 minggu. Evaluasi pertumbuhan dan analisis kandungan senyawa organosulfur dilakukan setelah perlakuan selama 2 minggu, yaitu pada fase antara fase deselerasi dan fase stasioner.

Evaluasi pertumbuhan sel terhadap kultur suspensi sel hasil perlakuan pemberian prekursor dan elisitor meliputi berat biomassa (berat basah dan berat kering), indeks pertumbuhan sel dan SCV. Analisis terhadap produksi senyawa organosulfur pada kultur suspensi sel hasil perlakuan pemberian prekursor dan elisitor dilakukan dengan melihat profil dan kandungan senyawa organosulfur hasil perlakuan. Untuk memperoleh ekstrak dengan kandungan senyawa bioaktif organosulfur dilakukan ekstraksi terhadap suspensi sel masing-masing perlakuan. Teknik analisis UHPLC digunakan untuk memisahkan komponen senyawa bioaktif organosulfur yang terkandung dalam ekstrak dengan tujuan untuk mengetahui kadar dan profil dari komponen senyawa bioaktif organosulfur.

3.2.2 Penelitian Kualitatif (*dry-lab*)

Penelitian kualitatif dilakukan untuk melihat interaksi antara prekursor (ligan) dengan enzim-enzim yang berperan dalam lintasan biosintesis senyawa organosulfur (protein target) dengan menggunakan pendekatan *in silico* (bioinformatika). Penelusuran dilakukan dengan menggunakan beberapa *software* dan *web server* dari program komputasi untuk memperoleh gambaran interaksi yang terjadi antara ligan-protein target. Prediksi potensi prekursor dilakukan dengan cara melakukan proses molekular *docking* antara prekursor dan dengan protein target (enzim-enzim yang berperan dalam biosintesis senyawa bioaktif organosulfur).



3.3 Langkah Penelitian

3.3.1 Induksi dan multiplikasi kalus

Bawang putih tunggal varietas Tawangmangu Baru yang diperoleh dari petani di daerah Magelang Jawa Tengah digunakan sebagai eksplan. Kalus diinduksi dari 3 jenis bagian eksplan, yaitu *crown*, tunas bagian tengah, tunas bagian ujung (Gambar 11). Perlakuan terhadap 3 jenis bagian eksplan ini bertujuan untuk memperoleh kalus dari eksplan yang dapat memberikan respon terbaik dalam pembentukan kalus. Sebelum dilakukan inokulasi, dilakukan sterilisasi terhadap umbi bawang putih tunggal yang bertujuan untuk menghilangkan kontaminan. Umbi bawang putih tunggal terlebih dahulu dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran (tanah) yang menempel pada permukaan umbi. Selanjutnya umbi bawang putih tunggal direndam dengan menggunakan sodium hypochlorite 5,25% (NaOCl) selama 10 menit, kemudian dibilas dengan dengan aquades steril sebanyak 3 kali.



Gambar 11. Eksplan tunas bawang putih tunggal

Induksi kalus dilakukan di dalam *laminar air flow* (LAF) yang sebelumnya juga telah disterilisasi. Tiga jenis bagian eksplan, yaitu *crown*, tunas bagian tengah, tunas bagian ujung dari umbi bawang putih tunggal masing-masing dipotong dengan ukuran 2 mm x 2 mm dan diinokulasikan pada medium induksi kalus dalam botol kultur. Setiap botol kultur berisi 5 potongan eksplan dari masing-masing jenis eksplan. Medium induksi kalus yang digunakan adalah medium MS yang ditambah zat pengatur tumbuh 0,3 ppm 2,4-D dan 0,5 ppm kinetin (Fauziah & Widoretno, 2015). Kultur diletakkan pada rak kultur dan diinkubasi dengan intensitas cahaya 600 lux, pencahayaan 16 jam periode dan suhu 25-26°C selama 4-5 minggu. Setiap minggu dilakukan pengamatan terhadap pertumbuhan kalus, yang meliputi pengamatan terhadap awal terbentuknya kalus, prosentase terbentuknya kalus, warna kalus dan friabilitas

kalus. Pada kalus yang terbentuk selanjutnya dilakukan multiplikasi kalus dengan cara melakukan sub kultur setiap 4 minggu sekali menggunakan medium baru dengan komposisi yang sama dengan medium induksi kalus.

3.3.2 Inisiasi dan multiplikasi suspensi sel

Inisiasi suspensi sel dilakukan menggunakan kalus yang telah diperoleh. Inisiasi dilakukan dengan cara mengkultur 1 g massa sel dari kultur kalus sebelumnya ke dalam 25 ml medium cair MS dengan penambahan zat pengatur tumbuh 0,3 ppm 2,4-D dan 0,5 ppm kinetin dalam erlenmeyer 100 ml. Inkubasi dilakukan dengan penggojokan menggunakan shaker pada 100 rpm dan temperatur 20°C. Multiplikasi dilakukan dengan cara melakukan sub kultur terhadap suspensi sel secara rutin setiap 2 minggu sekali dengan mentransfer 1 g massa sel dari kultur sebelumnya ke dalam 25 ml medium cair MS baru pada erlenmeyer 100 ml. Kultur suspensi sel hasil multiplikasi selanjutnya akan digunakan pada perlakuan pemberian elisitor dan prekursor.

3.3.3 Pembuatan kurva pertumbuhan kultur suspensi sel

Sebelum dilakukan elisitasi dan pemberian prekursor, terlebih dahulu dibuat kurva pertumbuhan kultur suspensi sel. Sebanyak 0,5 g kalus dikulturkan ke dalam 10 ml medium cair yang mempunyai komposisi sama dengan medium inisiasi suspensi sel. Pengukuran biomasa sel dengan menggunakan metode SCV dilakukan setiap 3 hari selama 3 minggu sampai pertumbuhan mengalami penurunan dengan tujuan untuk mengetahui umur kultur yang optimum guna memperoleh massa sel dan produksi senyawa organosulfur tertinggi dalam kultur suspensi sel bawang putih tunggal.

3.3.4 Elisitasi kultur suspensi sel dengan elisitor Fe^{3+} dan Zn^{2+}

Elisitasi terhadap kultur suspensi sel dilakukan dengan menggunakan 2 macam elisitor logam yaitu ZnSO_4 dan FeCl_3 . Masing-masing elisitor logam diberikan dengan konsentrasi yang berbeda, yaitu 0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 mM. Kultur suspensi sel umur 0 minggu hasil sub kultur ke-3 digunakan untuk perlakuan elisitasi. Sebanyak 1 g massa sel ditransfer ke dalam medium cair MS baru yang masing-masing sudah ditambah dengan ZnSO_4 dan FeCl_3 sesuai dengan konsentrasi perlakuan elisitasi. Medium cair MS tanpa penambahan ZnSO_4 dan FeCl_3

digunakan sebagai kontrol. Kultur suspensi sel diinkubasi dengan penggojokan menggunakan shaker pada 100 rpm dan temperatur 20°C. Kultur suspensi sel dipanen dan dianalisis pada umur 2 minggu untuk mendapatkan kinetika pertumbuhan kultur suspensi sel dan akumulasi senyawa bioaktif organosulfur. Pengaruh pemberian elisitor logam $ZnSO_4$ dan $FeCl_3$ pada kultur suspensi sel dievaluasi berdasarkan pertumbuhan kultur dan kandungan senyawa organosulfur pada suspensi sel. Pengaruh pemberian prekursor terhadap pertumbuhan kultur suspensi sel dilihat dari pengukuran biomassa sel yang meliputi berat basah, berat kering, *settled cell volume* dan indeks pertumbuhan (Vargas & Alejo, 2012), sedangkan analisis senyawa organosulfur pada kultur suspensi sel dilakukan dengan metode HPLC.

3.3.5 Pemberian prekursor (*precursor feeding*) glutation dan sistein pada kultur suspensi sel bawang putih tunggal

Perlakuan pemberian prekursor terhadap kultur suspensi sel dilakukan dengan menggunakan 2 macam prekursor yaitu glutation dan sistein. Masing-masing jenis prekursor diberikan dengan konsentrasi yang berbeda, yaitu 0; 5; 7,5; 10; 12,5; 15 mM. Kultur suspensi sel umur 2 minggu digunakan untuk perlakuan pemberian prekursor. Sebanyak 1 g massa sel ditransfer ke dalam medium cair MS baru yang masing-masing sudah ditambah dengan glutation dan sistein sesuai dengan konsentrasi perlakuan pemberian prekursor. Medium cair MS tanpa penambahan glutation dan sistein digunakan sebagai kontrol. Kultur suspensi sel diinkubasi dengan penggojokan menggunakan shaker pada 100 rpm dan temperatur 20°C, dan dipanen serta dianalisis pada umur 2 minggu untuk mendapatkan kinetika pertumbuhan kultur suspensi sel dan akumulasi senyawa bioaktif organosulfur. Pengaruh pemberian prekursor pada kultur suspensi sel dievaluasi berdasarkan pertumbuhan kultur dan kandungan senyawa organosulfur pada suspensi sel. Pengaruh pemberian prekursor terhadap pertumbuhan kultur suspensi sel dilihat dari pengukuran biomassa sel yang meliputi berat basah, berat kering, SCV dan indeks pertumbuhan (Vargas & Alejo, 2012), sedangkan analisis senyawa organosulfur pada kultur suspensi sel dilakukan dengan metode HPLC.

3.3.6 Evaluasi pertumbuhan kultur suspensi sel hasil elisitasi dan prekursor feeding

Evaluasi pertumbuhan kultur suspensi sel meliputi biomassa sel (berat basah, berat kering), indeks pertumbuhan dan SCV.

3.3.6.1 Biomassa sel

Pengukuran biomassa sel meliputi pengukuran berat basah dan berat kering sel. Pada pengukuran berat basah sel terlebih dahulu dilakukan pengendapan dengan cara sentrifugasi terhadap suspensi sel. Sel yang terendapkan diletakkan diatas kertas hisap untuk menghilangkan air yang masih terikut. Selanjutnya dilakukan penimbangan terhadap sel. Pengukuran berat kering sel dilakukan dengan cara mengeringkan sel dalam oven pada suhu 60°C selama 12 jam dan setelah dingin selanjutnya dilakukan penimbangan.

3.3.6.2 Indeks pertumbuhan

Indeks pertumbuhan dihitung dengan menggunakan rumus:

$$I = \frac{Xa - Xo}{Xo}$$

I = Indeks pertumbuhan

Xa = Berat akhir sel

Xo = Berat awal sel

3.3.6.3 *Settled Cell Volume* (SCV)

Settled Cell Volume (SCV) adalah pengukuran volume sel setelah dilakukan pengendapan. Pengukuran SCV dilakukan dengan cara menuangkan 25 ml suspensi sel ke dalam gelas ukur dengan ukuran volume 25 ml dan ketelitian 0,1. Suspensi sel didiamkan selama 1 jam hingga seluruh sel terendapkan. Nilai SCV diperoleh dari fraksi volume sel yang terendapkan.

3.3.7 Analisis senyawa organosulfur

3.3.7.1 Ekstraksi senyawa organosulfur

Ekstraksi terhadap suspensi sel bawang putih tunggal hasil perlakuan elisitasi dan pemberian prekursor dilakukan dengan metode ekstraksi menggunakan campuran pelarut etanol-dietil eter (Kadhim Al-Dulimy *et al.*, 2013). Sebanyak 0,1 – 2 g sampel diletakkan dalam mortar kemudian ditambahkan 10 ml larutan campuran etanol : dietil eter (1:1). Campuran ditumbuk dengan menggunakan pistil hingga halus dan tercampur dengan baik. Selanjutnya larutan dipindahkan ke dalam botol kaca berwarna. Larutan disaring dengan vaccum filter menggunakan kertas saring whatman no. 40. Filtrat yang diperoleh diencerkan

dalam labu takar dengan menambahkan larutan pengencer campuran etanol : dietil eter (1:1) hingga volume tepat 25 ml. Selanjutnya dilakukan pemekatan terhadap larutan dengan rotary evaporator hingga diperoleh 5 ml larutan pekat. Sebanyak 0,1 ml larutan pekat ditambahkan dengan 4,5 ml larutan campuran 10 mM potassium dihydrogen phosphate : acetonitrile (1:1) dan dihomogenkan dengan menggunakan vortex. Larutan yang telah homogen siap diinjeksikan ke dalam perangkat HPLC.

3.3.7.2 Analisis kadar dan komponen senyawa organosulfur

Instrumen yang digunakan untuk menganalisis keberadaan dan kandungan senyawa organosulfur dalam filtrat hasil ekstraksi suspensi sel bawang putih tunggal adalah HPLC Shimadzu dengan jenis kolom Shim-pack VP ODS (5 μ m 150 x 4,6 mm) sebagai fasa diam. Detektor yang digunakan adalah tipe SPD 20-A UV-Vis dengan panjang gelombang 210 nm. Fasa gerak yang digunakan adalah 10 mM Potassium dihydrogen phosphate : Acetonitrile (1:1)(v/v) secara isokratik dengan kecepatan alir 1ml/menit.

3.3.8 Penelitian kualitatif (*dry-lab*)

Potensi dari glutation dan sistein sebagai prekursor ditelusuri dengan menggunakan pendekatan *in silico* (bioinformatika). Penelitian dilakukan dengan menggunakan beberapa *software* dan *web server* dari program komputasi untuk memperoleh gambaran reaksi-reaksi biokimia pada tingkat molekuler. Prediksi dari peran dan potensi prekursor dilakukan dengan cara melakukan proses molekular *docking* antara glutation dan sistein sebagai ligan, dan enzim yang berperan dalam jalur biosintesis organosulfur sebagai protein target.

Preparasi ligan dilakukan dengan menelusuri aktivitas senyawa menggunakan *database Pass Server* (<http://www.pharmaexpert.ru/passonline/>). Efek potensial suatu senyawa terhadap protein target sebagai patner interaksinya dianalisis dan diprediksi menggunakan *database STITCH* (<http://stitch.embl.de>). Koleksi struktur 3 dimensi ligan diperoleh menggunakan *database Pubchem* (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). Preparasi protein dilakukan dengan Protein yang berperan dalam jalur biosintesis alliin dianalisis dan diprediksi menggunakan *database Plant Metabolic Pathway* (<https://plantcyc.org/>), dan *database STITCH* (<http://stitch.embl.de>) untuk mengetahui berbagai interaksinya dengan senyawa lain. Koleksi struktur 3 dimensi dari protein target dilakukan dengan memodelkan ke dalam database SWISS-

MODEL Repository (<https://swissmodel.expasy.org/>). Selanjutnya dilakukan *molekular docking* dengan menggunakan *software* PyRx 0.8 untuk memperoleh posisi pengikatan terbaik. Senyawa dengan *binding affinity* paling rendah disimpan dalam format PDB dan siap untuk dilakukan visualisasi interaksi secara 3 dimensi menggunakan *software* PyMol. Skema 2 dimensi dan jenis interaksi reseptor dengan ligan yang terbentuk divisualisasikan dengan menggunakan *software* Discovery Studio.

3.3.9 Rancangan penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Kelompok (RAK) menggunakan ulangan sebagai kelompok. Variabel bebas pada perlakuan elisitasi adalah jenis elisitor (ZnSO_4 , FeCl_3) dan konsentrasi elisitor (0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 mM). Variabel bebas pada perlakuan pemberian prekursor jenis prekursor (glutathione, sistein) dan konsentrasi prekursor (0; 5; 7,5; 10; 12,5; 15 mM). Variabel terikat untuk kedua perlakuan tersebut meliputi berat basah sel, berat kering sel, indeks pertumbuhan sel, dan SCV.

3.3.10 Analisis data

Analisis data pada penelitian ini menggunakan *software* SPSS versi 25. Pengaruh jenis elisitor dan jenis prekursor terhadap pertumbuhan sel (berat basah, berat kering, indeks pertumbuhan dan SCV) ditentukan dengan menggunakan Uji t (*Independent Sample T test*) untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan antara dua kelompok elisitor dan dua kelompok prekursor. Pengaruh jenis konsentrasi elisitor dan jenis prekursor terhadap pertumbuhan sel (berat basah, berat kering, indeks pertumbuhan dan SCV) ditentukan dengan menggunakan analisis ragam ANOVA (*Analysis of Varians*). Uji lanjutan untuk perbedaan antara setiap perlakuan (berat basah, berat kering, indeks pertumbuhan dan SCV) ditentukan dengan menggunakan Uji Beda Nyata Terkecil pada selang kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$).

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pengaruh Jenis Eksplan Terhadap Pembentukan Kalus

Jenis eksplan sangat berpengaruh terhadap terbentuknya kalus. Ketiga jenis eksplan memberikan respon yang berbeda dalam pembentukan kalus. Eksplan *crown* berhasil membentuk kalus, sedangkan eksplan tunas ujung dan tunas tengah tidak berhasil membentuk kalus (Gambar 12). Eksplan *crown* menunjukkan tanda-tanda awal pembentukan kalus setelah 1 minggu umur kultur. Pada kultur umur 2 minggu terbentuk kalus menutupi permukaan eksplan, dan semakin tebal pada kultur umur 4 minggu. Pada kultur umur 6 minggu pertumbuhan kalus semakin bertambah dan terus meningkat hingga umur 8 minggu. Kalus yang terbentuk berwarna putih kekuningan dengan tipe remah sedikit kompak. Eksplan *crown* menunjukkan keberhasilan lebih dari 80% dalam membentuk kalus, sedangkan eksplan tunas ujung dan tunas tengah tidak mampu (0%) membentuk kalus.



Gambar 12. Respon pertumbuhan tiga jenis eksplan pada medium induksi kalus (MS + 2,4-D 0,3 ppm + kinetin 0,5 ppm) selama 8 minggu kultur. (a) *crown*, (b) tunas ujung, (c) tunas tengah.

Eksplan tunas ujung tidak memberikan respon terhadap pertumbuhan kalus selama masa kultur. Semua eksplan tunas ujung yang diinokulasikan pada medium kultur tidak berhasil membentuk kalus. Eksplan menunjukkan perubahan setelah 1 minggu umur kultur. Eksplan sedikit membesar pada kultur umur 2 minggu, dan semakin membesar dan memanjang dengan bertambahnya umur kultur. Pada kultur umur 6 minggu warna eksplan mengalami perubahan menjadi hijau muda. Pada kultur umur 8 minggu panjang eksplan mencapai ± 1 cm sampai 1,5 cm dengan perubahan warna menjadi hijau tua.

Pada kultur dengan eksplan tunas tengah, semua eksplan yang dikulturkan pada medium kultur tidak berhasil dalam membentuk kalus. Eksplan yang dikulturkan pada medium kultur memberikan respon pemanjangan tunas selama masa kultur. Eksplan mulai membesar dan memanjang setelah 1 minggu umur kultur dan mulai tampak jelas pada kultur umur 2 minggu. Pada kultur umur 4 minggu, 50% dari eksplan yang diinokulasikan memanjang hingga $\pm 1,5$ cm sampai 2 cm, sedangkan 50% eksplan lainnya masih memberikan respon membesar saja tanpa menunjukkan pemanjangan tunas. Pada kultur umur 4 minggu, 80% hingga 100% tunas semakin membesar dan memanjang. Pada kultur umur 8 minggu, panjang tunas pada semua eksplan mencapai ± 4 cm sampai 6 cm.

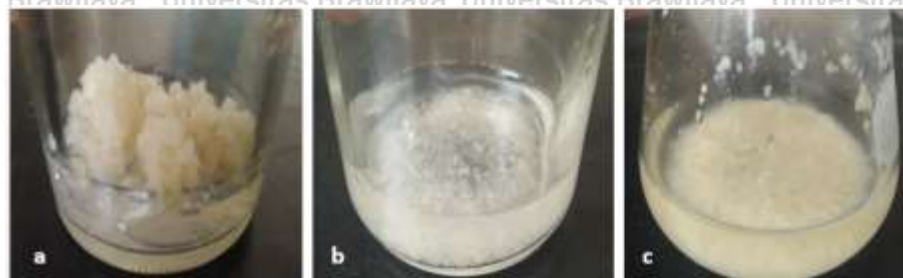
Setiap sel atau jaringan dari tanaman yang meristematik dapat digunakan sebagai eksplan untuk induksi kalus. Hal ini didasarkan bahwa sel atau jaringan mempunyai kemampuan untuk mengekspresikan totipotensi, yaitu kemampuan genetik secara otonom untuk tumbuh dan berkembang menjadi individu baru apabila ditumbuhkan pada medium yang sesuai (Mantel *et al.*, 1985). Meskipun semua bagian jaringan dari tanaman dapat digunakan untuk menumbuhkan individu baru, tetapi faktor-faktor dalam pemilihan eksplan harus dipertimbangkan. Jenis eksplan merupakan salah satu faktor penting dalam keberhasilan induksi kalus, disamping faktor penting lainnya seperti genotip, konsentrasi dan kombinasi pemakaian ZPT (Mustafa, 2012; Scotton *et al.*, 2013). Menurut Smith (2013), bagian tanaman yang bisa digunakan untuk induksi kalus antara lain kotiledon, hipokotil, batang, daun, dan embrio. Eksplan *crown* dapat membentuk kalus sebagai respons terhadap luka dan menghasilkan sel-sel yang membelah secara terus menerus dengan tidak terorganisir. *Crown* merupakan eksplan terbaik untuk membentuk kalus pada bawang putih tunggal. Jaringan muda yang bersifat meristematik pada eksplan *crown* lebih mudah untuk dediferensiasi dan

menghasilkan kalus. Jaringan muda memiliki kemampuan regenerasi yang tinggi dibandingkan dengan jaringan yang lebih tua (Smith, 2013).

Kemampuan eksplan *crown* untuk membentuk kalus pada spesies yang berbeda juga dilaporkan antara lain pada penelitian Yan *et al.* (2009) yang menyatakan *crown* mampu membentuk kalus sebesar 47,5% pada kultur kalus *Allium chinense*. *Crown* juga mampu membentuk kalus sebesar 70% pada kultur kalus *Allium cepa* (Hailekidan *et al.*, 2013), dan sebesar 60% pada kultur kalus *Allium hirtifolium* (Farhadi *et al.*, 2017). Penggunaan eksplan ujung tunas yang dilaporkan mampu membentuk kalus, antara lain pada kultur kalus *Solanum tuberosum* L. dengan prosentase pembentukan kalus sebesar 95% (Laboney *et al.*, 2013), dan sebesar 80% pada kultur kalus *Dendrocalamus hamiltonii* (Zang *et al.*, 2016).

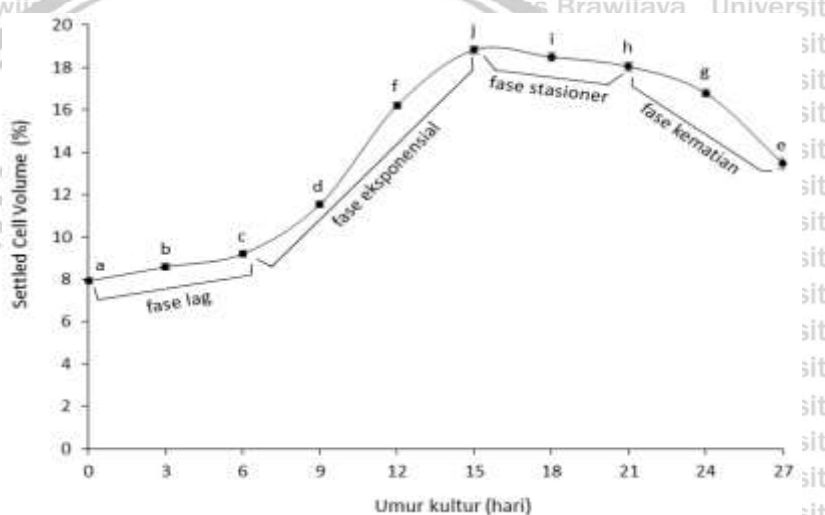
4.2 Inisiasi dan Multiplikasi Kultur Suspensi Sel Bawang Putih Tunggal

Kultur suspensi sel adalah teknik di mana sel tumbuh sebagai sel tunggal atau agregat sel yang tersuspensi dalam media nutrisi cair. Sel dalam suspensi dapat tumbuh lebih cepat karena semua sel terdistribusi secara merata dalam medium nutrisi. Kondisi kultur yang dapat dikontrol menghasilkan pertumbuhan kultur suspensi sel yang optimal. Inisiasi suspensi sel adalah langkah utama yang harus dilakukan dalam proses pembentukan kultur suspensi sel. Inisiasi dilakukan dengan mentransfer kalus ke dalam medium cair MS. Kecepatan multiplikasi kultur suspensi sel sangat ditentukan oleh kalus dengan konsistensi remah, karena kalus remah mudah terpecah-pecah selama penggojokan di dalam medium cair. Menurut Nehgadary *et al.* (2015), kalus dengan konsistensi remah sangat bagus digunakan untuk mendapatkan kultur suspensi yang baik. Pada kultur suspensi umur 0 hari, kalus yang ditransfer masih berbentuk agregat sel dengan butiran agak besar. Agregat sel secara perlahan hancur membentuk rumpun sel yang berwarna kuning pucat dan menjadi seragam pada umur 2 minggu (Gambar 13).



Gambar 13. Kalus untuk inisiasi dan kultur suspensi sel. (a) kalus remah hasil subkultur (b) pada saat baru diinisiasi umur 0 hari, (c) umur 2 minggu kultur

Fase pertumbuhan kultur suspensi sel sangat penting untuk melihat pertumbuhan sel dan menentukan fase senyawa bioaktif diproduksi dan terakumulasi. Pertumbuhan sel dalam kultur suspensi dapat diamati dengan menggunakan beberapa metode antara lain pengukuran berat basah, berat kering, jumlah sel, viabilitas sel, dan SCV (Mustafa *et al.*, 2011). Kurva pertumbuhan kultur suspensi sel bawang putih tunggal yang diamati berdasarkan SCV selama 27 hari kultur menunjukkan pola pertumbuhan sigmoid dengan empat fase yang berbeda, yaitu dimulai dengan fase lag, kemudian diikuti oleh fase eksponensial, fase stasioner dan berakhir dengan fase kematian (Gambar 14).



Gambar 14. Kurva pertumbuhan kultur suspensi sel bawang putih tunggal

Awal kultur suspensi sel ditandai dengan fase lag mulai hari ke-0 sampai hari ke-6. Selama periode ini fraksi sel dari kultur suspensi sel meningkat dengan lambat dan tidak menunjukkan kenaikan yang signifikan. Hal ini menunjukkan bahwa sel-sel yang membelah hanya sedikit disebabkan suspensi sel berada dalam masa adaptasi. Kultur suspensi sel bawang putih tunggal memasuki fase eksponensial pada hari ke-6. Pada fase eksponensial ini suspensi sel mengalami pertumbuhan yang cepat karena sel-sel aktif membelah. Laju pertumbuhan suspensi sel berangsur-angsur meningkat dan mencapai maksimum pada hari ke-15, dengan peningkatan fraksi sel hampir 2,5 kali lipat. Kultur suspensi sel bawang putih tunggal memasuki fase stasioner pada hari ke-15 hingga hari ke-21. Pada fase ini pertumbuhan kultur suspensi sel cenderung berhenti dengan sedikit penurunan tetapi tidak berubah secara signifikan. Pertumbuhan kultur suspensi sel mulai menurun pada hari ke-21 hingga hari ke-27

dengan terjadinya penurunan yang signifikan. Pada fase ini sel memasuki fase kematian yaitu fase berhentinya proses pembelahan sel. Sel-sel banyak mengalami kematian yang diikuti dengan proses lisis. Hal ini menyebabkan prosentase pengendapan sel mengalami penurunan.

Berdasarkan kurva pertumbuhan kultur suspensi sel bawang putih tunggal, umur kultur yang optimum guna memperoleh massa sel dan akumulasi senyawa organosulfur adalah pada hari ke 15, yaitu pada fase diantara akhir fase eksponensial dan awal fase stasioner. Pada fase ini massa sel mengalami pertumbuhan maksimum dan kultur suspensi sel sudah memasuki periode metabolisme sekunder.

Dalam siklus pertumbuhan kultur suspensi sel, pada umumnya sel mengalami empat fase pertumbuhan yaitu fase lag, fase eksponensial, fase stasioner dan fase kematian (Puad *et al.*, 2019). Pertumbuhan dapat diartikan sebagai pertambahan jumlah, ukuran atau massa sel. Kultur suspensi sel pada beberapa spesies tanaman memiliki kinetika pertumbuhan yang berbeda-beda. Kultur suspensi sel *Citrus suhuiensis* hanya memiliki 3 fase pertumbuhan yaitu fase lag, fase eksponensial dan fase kematian (Puad *et al.*, 2018), sedangkan kultur suspensi *Sorghum bicolor* (L.) Moench memiliki 3 fase pertumbuhan yang berbeda yaitu fase lag, fase eksponensial dan fase stasioner (Ramufliho *et al.*, 2019).

Fase lag merupakan fase adaptasi sel dengan media kultur. Pada fase ini sel tidak mengalami pembelahan, pertumbuhan sel terjadi dengan lambat dan secara perlahan (Pan, 2020). Setelah sel menyesuaikan diri dengan media kultur maka sel memasuki fase logaritmik atau fase eksponensial. Fase ini ditandai dengan periode pertumbuhan sel dengan cepat hingga mencapai maksimum. Fase selanjutnya adalah fase stasioner yaitu fase dengan laju pertumbuhan sel sama dengan laju kematian sel, sehingga jumlah sel cenderung tetap. Keseimbangan jumlah sel terjadi karena adanya pengurangan pembelahan sel. Fase stasioner selanjutnya diikuti dengan penurunan jumlah sel secara gradual (Khanpour-Ardestani *et al.*, 2014). Fase kematian ditandai dengan banyaknya sel yang mati dibandingkan dengan yang hidup. Kematian sel antara lain disebabkan karena berkurangnya nutrisi (Ramufliho *et al.*, 2019).

Karakteristik kinetika dari akumulasi metabolit sekunder di dalam suspensi sel berbeda-beda. Pola perubahan akumulasi setiap metabolit sekunder pada suspensi sel tidak selalu sama dengan pola pertumbuhan suspensi sel. Pan (2020) melaporkan, kultur suspensi sel *Bletilla striata* Rehb.f. mempunyai 6 fase pertumbuhan, yaitu fase lag, fase eksponensial, fase linier,

fase perlambatan, fase stasioner, fase kematian. Pertumbuhan maksimum dari suspensi sel *Bletilla striata* Rchb.f. tercapai pada akhir fase linier atau pada awal fase stasioner. Senyawa *p*-hidroksibenzyl alcohol, *dactylorhin A*, *militarine* dan *coelonin* dalam kultur suspensi sel *Bletilla striata* Rchb.f. terakumulasi pada fase yang berbeda. Senyawa *coelonin* terakumulasi maksimum pada fase eksponensial, sedangkan *dactylorhin A* dan *militarine* terakumulasi maksimum pada akhir fase eksponensial. Senyawa *p*-hidroksibenzil alkohol terakumulasi pada akhir fase linier dan maksimum pada fase stasioner.

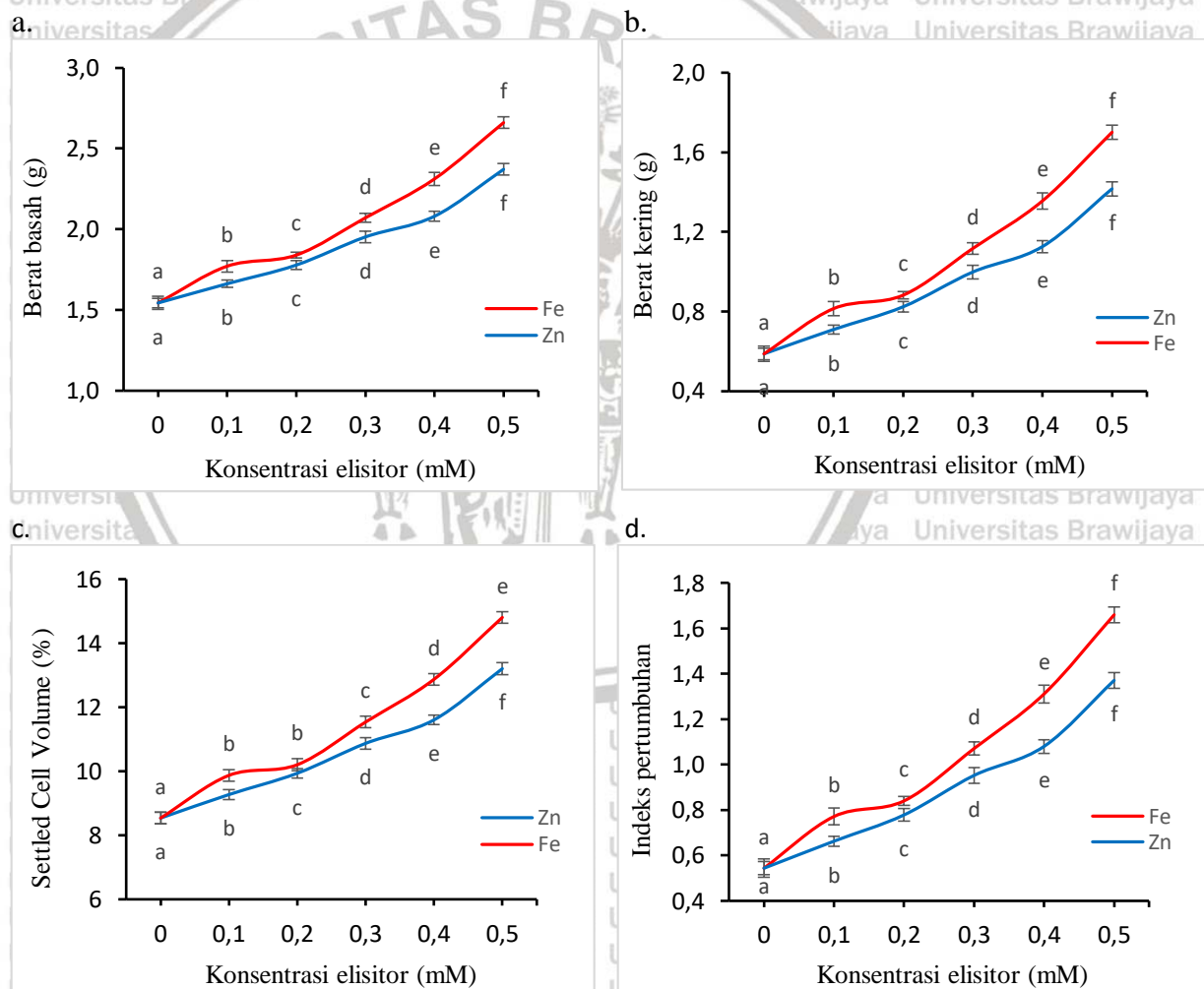
4.3 Pengaruh Elisitasi Fe^{3+} dan Zn^{2+} Terhadap Pertumbuhan Kultur Suspensi Sel Bawang Putih Tunggal

Pemberian elisitor Fe^{3+} dan Zn^{2+} pada medium kultur berpengaruh terhadap pertumbuhan kultur suspensi sel bawang putih tunggal. Elisitor Fe^{3+} dan Zn^{2+} pada medium kultur meningkatkan berat basah, berat kering, SCV dan indeks pertumbuhan kultur suspensi sel bawang putih tunggal. Semakin tinggi konsentrasi elisitor Fe^{3+} dan Zn^{2+} , semakin tinggi berat basah, berat kering, SCV dan indeks pertumbuhan kultur suspensi sel bawang putih tunggal (Gambar 15).

Peningkatan pertumbuhan sel mulai terjadi pada konsentrasi 0,1 mM dan semakin jelas terlihat pada konsentrasi 0,2 mM hingga 0,5 mM. Pemberian 0,5 mM elisitor Fe^{3+} maupun Zn^{2+} pada media kultur, menghasilkan berat basah sel tertinggi masing-masing 2,66 g dan 2,37 g. Elisitor Fe^{3+} mampu meningkatkan hampir 2 kali lipat berat basah sel, sedangkan elisitor Zn^{2+} mampu meningkatkan 1,5 kali lipat berat basah sel dibandingkan pada medium tanpa perlakuan (1,54 g) (Gambar 15a). Berat kering sel hasil elisitasi Fe^{3+} dan Zn^{2+} juga meningkat dengan semakin bertambahnya konsentrasi elisitor. Pemberian 0,5 mM elisitor Fe^{3+} maupun Zn^{2+} pada media kultur, menghasilkan berat kering sel tertinggi masing-masing 1,70 g dan 1,42 g. Elisitor Fe^{3+} 0,5 mM mampu meningkatkan berat kering sel 3 kali lipat dibandingkan dengan kontrol, sedangkan elisitor Zn^{2+} mampu meningkatkan berat kering sel hampir 2,5 kali lipat dibandingkan dengan kontrol (Gambar 15b).

Elisitasi menggunakan Fe^{3+} dan Zn^{2+} juga meningkatkan *settled cell volume* dengan semakin bertambahnya konsentrasi elisitor. *Settled cell volume* menyatakan persentase volume sel yang mengendap dibandingkan dengan volume media kultur cair. Pada media kultur yang tidak dilakukan elisitasi, nilai SCV adalah sebesar 8,53%. Konsentrasi tertinggi dari kedua

elisitor masing-masing menghasilkan nilai SCV 14,8% pada pemberian Fe^{3+} dan 13,2% pada pemberian Zn^{2+} (Gambar 15c). Indeks pertumbuhan mengalami peningkatan dengan semakin bertambahnya konsentrasi elisitor. Pada konsentrasi tertinggi, pemakaian elisitor Fe^{3+} menghasilkan indeks pertumbuhan 3 kali lipat (1,67) dibandingkan kontrol (0,54), sedangkan pemakaian elisitor Zn^{2+} menghasilkan indeks pertumbuhan 2,5 kali lipat (1,37) dibandingkan kontrol (0,54) (Gambar 15d). Meskipun elisitor Fe^{3+} memiliki kecenderungan yang lebih tinggi dalam meningkatkan pertumbuhan biomassa sel dibandingkan Zn^{2+} , namun antara kedua jenis elisitor tersebut tidak memberikan perbedaan yang signifikan terhadap berat basah, berat kering, SCV maupun indeks pertumbuhan kultur suspensi sel bawang putih tunggal.



Gambar 15. Pengaruh konsentrasi Fe^{3+} dan Zn^{2+} pada pertumbuhan biomassa dalam kultur sel suspensi bawang putih tunggal. (a) berat basah. (b) berat kering. (c) *settled cell volume*. (d) indeks pertumbuhan. Keterangan: huruf kecil yang sama pada masing-masing jenis elisitor menunjukkan tidak beda nyata pada uji Beda Nyata Terkecil (BNT) pada taraf ketelitian 0,05

Pemberian Zn^{2+} dan Fe^{3+} sebagai elisitor pada medium kultur memberikan pengaruh terhadap pertumbuhan sel. Wang (2017) menyatakan bahwa ion logam yang ditambahkan ke dalam medium merupakan salah satu faktor yang dapat mempengaruhi pertumbuhan sel atau jaringan serta sintesis metabolit sekunder. Besi merupakan salah satu logam esensial karena berfungsi sebagai kofaktor dalam beberapa proses metabolisme seperti pembelahan sel, respirasi, fotosintesis, serta biosintesis asam lemak dan asam amino. Besi dapat meningkatkan pertumbuhan sel dengan menstimulasi pembelahan sel-sel meristematik. Roschztardtz *et al.* (2011) melaporkan bahwa logam Fe terakumulasi di dalam nukleolus sel tumbuhan dan terlibat dalam biosintesis RNA ribosom (rRNA). (Honda *et al.*, 2005) menambahkan, logam Fe terikat pada rRNA dalam jumlah tinggi baik secara in vitro maupun in vivo. rRNA adalah komponen utama penyusun ribosom dan merupakan ribozim yang melakukan sintesis protein dalam ribosom. Pada proliferasi sel meristematik, laju biogenesis ribosom berkorelasi dengan pertumbuhan sel yang diperlukan untuk pembelahan sel (Baserga *et al.*, 1984). Fungsi utama nukleolus adalah mensintesis rRNA, dimungkinkan logam Fe terikat pada rRNA untuk menjaga stabilitas ribosom ataupun mengkatalisasi pematangan subunit rRNA. Dalam siklus sel, protein yang disintesis pada tahap interfase yaitu pada fase G1 dan fase S sangat dibutuhkan dalam proses persiapan pada fase G2 untuk selanjutnya menuju fase M. Sesuai dengan pernyataan Manzano *et al.* (2013) bahwa proliferasi sel bergantung terus menerus pada suplai protein yang merupakan syarat utama untuk dapat mencapai jumlah yang diperlukan dalam pembelahan sel.

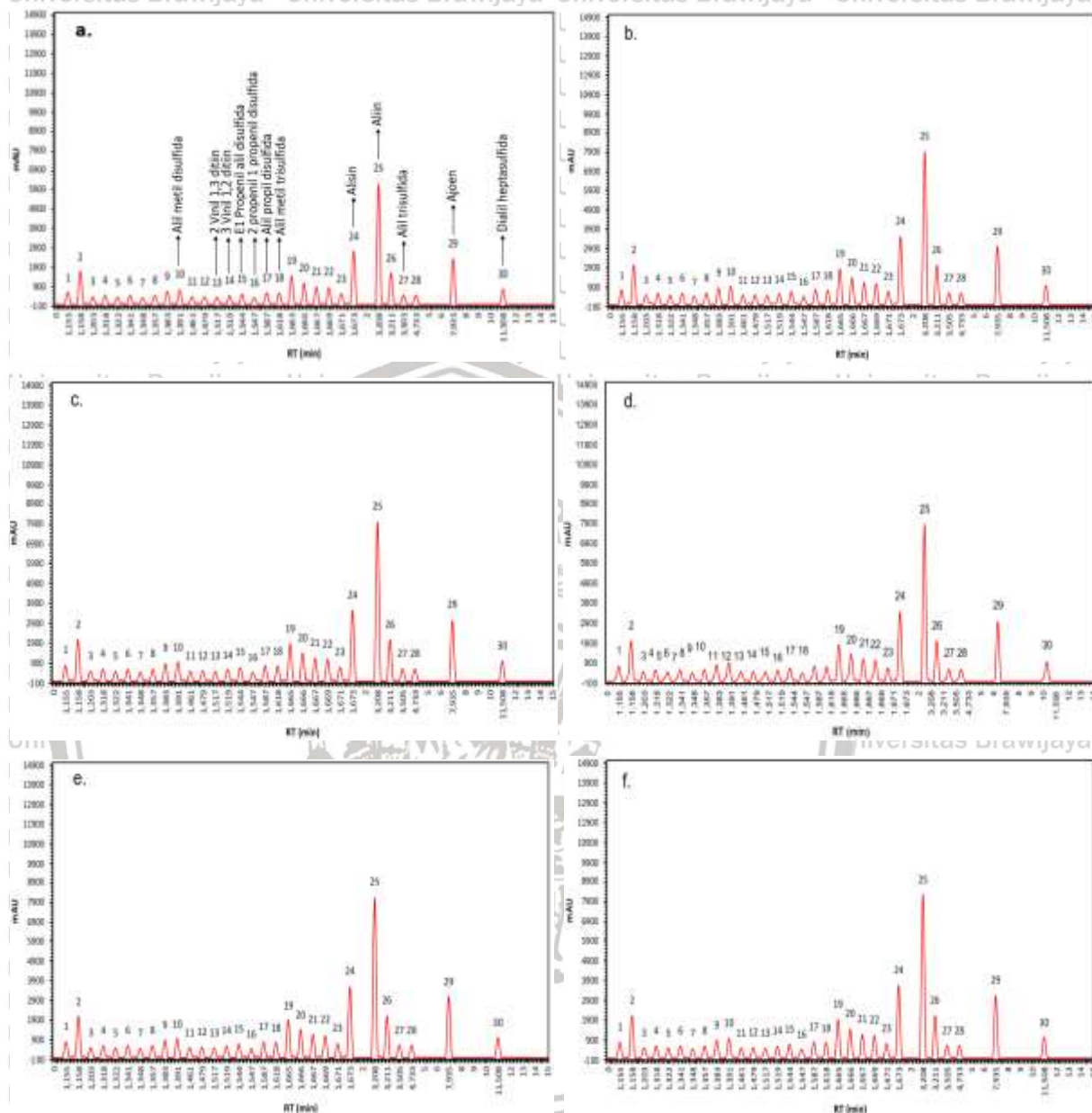
Demikian pula dengan Zn, logam Zn juga berperan sebagai kofaktor dari beberapa enzim seperti anhidrase, oksidase, peroksidase, dan berperan penting dalam sintesis asam nukleat (Cakmak, 2000), sintesis protein (Hänsch dan Mendel, 2009), proliferasi sel, fotosintesis, pengaturan metabolisme nitrogen dan sintesis auksin (Castillo-González *et al.*, 2018). Keterlibatan logam Zn terhadap pertumbuhan sel bergantung pada terjadinya pembelahan sel. Peningkatan jumlah nukleolus merupakan respon terhadap logam Zn yang terlibat dalam sintesis protein (Rout *et al.*, 2009), dan di dalam nukleolus logam Zn terikat pada RNA dan DNA (Broadley, 2007). Dengan demikian logam Zn mempunyai peran mengontrol ekspresi gen yang terlibat dalam pembelahan sel yang mengatur transkripsi secara langsung melalui efek pengikatan RNA dan DNA. Keberhasilan pemberian elisitor Zn telah dilakukan oleh beberapa peneliti, antara lain Kumar (2004) yang melaporkan bahwa

pemberian 0,15 mM logam Zn mampu meningkatkan berat basah sel pada kultur kalus *Pluchea lanceolata*. Fatima *et al.* (2011) juga melaporkan bahwa pemberian 0,3 mM logam Zn pada media kultur mampu meningkatkan regenerasi tunas hampir 2x lipat dibanding kontrol pada kultur *Withania somnifera*.

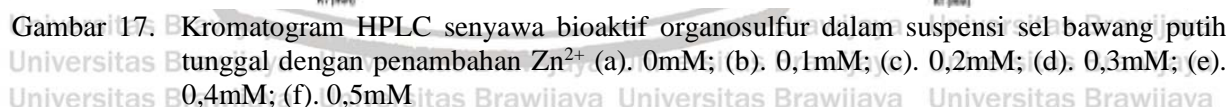
Namun demikian, pada konsentrasi tinggi logam Fe dan Zn dapat bersifat toksik, yang dapat menghambat aktivitas metabolik dan dapat menyebabkan kematian sel. Rout *et al.* (2014) melaporkan bahwa pemberian 40 mM Fe menunjukkan penghambatan pada perkecambahan, munculnya tunas dan akar pada tanaman padi. Logam Zn memberikan efek toksik pada konsentrasi 1 mM (Van Assche & Clijsters, 2006). Gejala toksisitas logam Zn pada tanaman adalah penghambatan pada pembelahan sel (Davies *et al.*, 1991) dan perpanjangan sel (Goldbold *et al.*, 1983). Terjadinya toksisitas dalam inti sel ujung akar *pigeon-pea* juga merupakan respons terhadap logam Zn, karena sitoplasma menjadi tidak terstruktur dan terjadi disintegrasi organel sel dengan pemberian 7,5 mM logam Zn (Sresty dan Madhava Rao, 1999).

4.4. Pengaruh Elisitor Fe^{3+} dan Zn^{2+} Terhadap Produksi Senyawa Bioaktif Organosulfur pada Kultur Suspensi Sel Bawang Putih Tunggal

Hasil analisis HPLC yang diperoleh berupa signal kromatogram dengan masing-masing puncak terbentuk sesuai dengan *retention time* (RT) dari masing-masing senyawa. Tinggi puncak menunjukkan respon serapan kromatogram yang dinyatakan dalam mili Absorbance Unit (mAU). Kromatogram analisis HPLC yang dihasilkan dari kultur suspensi sel bawang putih tunggal menggambarkan puncak-puncak yang menunjukkan jumlah dan macam senyawa bioaktif organosulfur yang terkandung dalam suspensi sel bawang putih tunggal. Sebanyak 30 macam senyawa organosulfur dihasilkan dalam analisis ini (Gambar 16;17). Dari 30 senyawa yang dihasilkan, beberapa diantaranya merupakan senyawa organosulfur utama, yaitu alliin; allisin; ajoen; allil metil disulfida; 2 vinil 1,3 dithiin; 3 vinil 1,2 dithiin; E1 propenil allil disulfida; 2 propenil 1 propenil disulfida; allil propil disulfida; allil metil trisulfida; allil trisulfida dan diallil heptasulfida. Tiga senyawa dengan puncak tertinggi ditunjukkan oleh alliin, allisin dan ajoen.



Gambar 16. Kromatogram HPLC senyawa bioaktif organosulfur dalam suspensi sel bawang putih tunggal dengan penambahan Fe^{3+} (a). 0mM; (b). 0,1mM; (c). 0,2mM; (d). 0,3mM; (e). 0,4mM; (f). 0,5mM



47

kadar yang bervariasi pada setiap konsentrasi perlakuan elisitor Fe^{3+} (Tabel 9). Pada suspensi sel tanpa perlakuan elisitasi, kadar senyawa organosulfur yang dihasilkan bervariasi antara 0,477 mg/g (2 propenil 1 propenil disulfida) sampai 8,906 mg/g (alliin). Kadar senyawa organosulfur semakin meningkat dengan semakin bertambahnya konsentrasi elisitor Fe^{3+} . Perlakuan menggunakan elisitor Fe^{3+} 0,5 mM memberikan hasil tertinggi pada kadar semua senyawa bioaktif organosulfur. Kadar senyawa organosulfur yang dihasilkan bervariasi antara 0,643 mg/g (2 propenil 1 propenil disulfida) sampai 11,976 mg/g (alliin). Dari semua senyawa organosulfur utama, alliin, allisin, ajoen dan diallil heptasulfida menghasilkan kadar lebih tinggi (masing-masing 11,976; 5,345; 4,572; 1,501 mg/g) dibandingkan senyawa organosulfur lainnya, seperti kelompok senyawa dithiin (2 vinil 1,3 dithiin, 3 vinil 1,2 dithiin) dan kelompok allil disulfida (allil metil disulfida, E1 propenil allil disulfida, 2 propenil 1 propenil disulfida, allil propil disulfida, allil metil trisulfida, allil trisulfida).

Tiga puluh macam senyawa bioaktif organosulfur juga terdeteksi pada perlakuan elisitor Zn^{3+} (Tabel 10). Perlakuan menggunakan elisitor Zn^{2+} 0,5 mM memberikan hasil tertinggi pada kadar semua senyawa bioaktif organosulfur. Kadar senyawa organosulfur yang dihasilkan bervariasi antara 0,692 mg/g (2 propenil 1 propenil disulfida) sampai 12,873 mg/g (alliin). Dari 12 senyawa organosulfur utama, alliin, allisin, ajoen dan diallil heptasulfida menghasilkan kadar paling tinggi (masing-masing 12,873; 5,746; 4,915; 1,614 mg/g).

Tabel 9. Macam dan kandungan senyawa organosulfur pada suspensi sel bawang putih tunggal dengan perlakuan elisitor Fe³⁺

Nomer puncak	Senyawa	Waktu retensi (RT)	Konsentrasi (mg/g) BB pada perlakuan Fe ³⁺					
			0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
1	1,2 Epitiopropan	1,155	0,906	1,080	1,111	1,040	1,120	1,168
2	Allil merkaptan	1,158	2,442	2,852	2,935	2,748	2,959	3,084
3	Dimetil disulfida	1,203	0,551	0,687	0,707	0,662	0,713	0,743
4	2,5 Dimetiltiopen	1,318	0,656	0,817	0,842	0,788	0,848	0,884
5	3 Metil 2 siklopentena 1 tion	1,322	0,560	0,672	0,692	0,648	0,698	0,727
6	Isobutil isotiosianat	1,341	0,661	0,823	0,847	0,793	0,854	0,890
7	2,5 Dimetiltetrahidrotiopen	1,348	0,493	0,614	0,692	0,592	0,637	0,664
8	Propil disulfida	1,357	0,662	0,824	0,848	0,794	0,855	0,891
9	1,3 Dithian	1,383	0,963	1,199	1,234	1,155	1,244	1,297
10	Allil metil disulfida	1,391	1,062	1,323	1,361	1,274	1,372	1,430
11	2,3,4 Tritiapentana	1,461	0,548	0,684	0,703	0,659	0,709	0,739
12	1,2 Dimercaptosiklopentana	1,479	0,564	0,703	0,723	0,677	0,729	0,760
13	2 Vinil 4H 1,3 ditiin	1,517	0,531	0,662	0,681	0,685	0,687	0,716
14	3 Vinil 4H 1,2 ditiin	1,519	0,634	0,790	0,813	0,819	0,820	0,855
15	E1 Propenil allil disulfida	1,544	0,747	0,931	0,958	0,961	0,966	1,006
16	2 Propenil 1 propenil disulfida	1,547	0,477	0,594	0,612	0,615	0,617	0,643
17	Allil propil disulfida	1,587	0,861	1,073	1,104	1,034	1,113	1,160
18	Allil metil trisulfida	1,618	0,836	1,041	1,070	1,003	1,080	1,125
19	Deoksialliin	1,665	2,087	2,597	2,673	2,502	2,694	2,808
20	Allil 2 propentiosulfinat	1,666	1,552	1,931	1,987	1,861	2,004	2,088
21	Trans 1 propenil allil tiosulfinat	1,667	1,283	1,597	1,643	1,538	1,656	1,726
22	1 propenil allil tiosulfinat	1,669	1,207	1,502	1,546	1,448	1,559	1,624
23	2 propen 1 asam sulfinotioat 1 propenil ester	1,671	0,777	0,968	0,996	0,933	1,004	1,047
24	Allisin	1,673	3,974	4,944	5,087	5,102	5,129	5,345
25	Alliin	3,208	8,906	11,078	11,399	11,460	11,491	11,976
26	Sikloalliin	3,211	2,317	2,883	2,966	2,778	2,990	3,117
27	Allil trisulfida	3,505	0,691	0,861	0,886	0,890	0,893	0,931
28	3,5 Dietil 1,2,4 tritioalan	4,733	0,681	0,848	0,873	0,817	0,880	0,917
29	Ajoen	7,935	3,399	4,229	4,352	4,375	4,387	4,572
30	Diallil heptasulfida	11,508	1,115	1,389	1,429	1,338	1,441	1,501

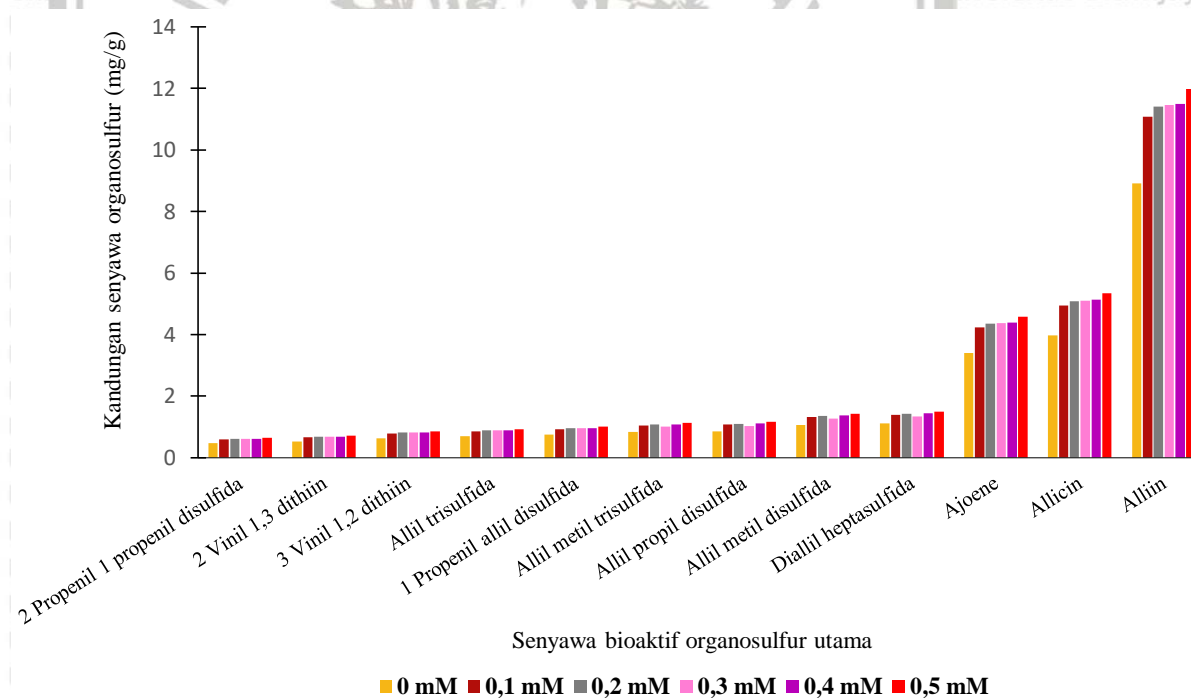
Catatan : Senyawa dengan penulisan cetak tebal merupakan senyawa organosulfur yang banyak berperan dalam mengatasi berbagai gangguan kesehatan

Tabel 10. Macam dan kandungan senyawa organosulfur pada suspensi sel bawang putih tunggal dengan perlakuan elisitor Zn^{2+}

Nomer puncak	Senyawa	Waktu retensi (RT)	Konsentrasi (mg/g) BB pada perlakuan Zn^{2+}					
			0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
1	1,2 Epitiopropan	1,155	0,906	1,256	1,305	1,627	1,430	1,256
2	Allil merkaptan	1,158	2,442	3,315	3,444	4,455	3,774	3,315
3	Dimetil disulfida	1,203	0,551	0,799	0,831	1,059	0,910	0,799
4	2,5 Dimetiltiopen	1,318	0,656	0,951	0,988	1,373	1,083	0,951
5	3 Metil 2 siklopentena 1 tion	1,322	0,560	0,782	0,813	1,053	0,891	0,782
6	Isobutil isotiosianat	1,341	0,661	0,958	0,995	1,219	1,091	0,956
7	2,5 Dimetiltetrahidrotiopen	1,348	0,493	0,715	0,743	0,727	0,814	0,715
8	Propil disulfida	1,357	0,662	0,959	0,996	1,133	1,092	0,959
9	1,3 Dithian	1,383	0,963	1,394	1,449	1,379	1,588	1,395
10	Allil metil disulfida	1,391	1,062	1,538	1,598	2,035	1,751	1,538
11	2,3,4 Tritiapentana	1,461	0,548	0,795	0,826	0,809	0,906	0,795
12	1,2 Dimercaptosiklopentana	1,479	0,564	0,818	0,849	0,888	0,931	0,818
13	2 Vinil 4H 1,3 ditiin	1,517	0,531	0,770	0,800	0,893	0,877	0,770
14	3 Vinil 4H 1,2 ditiin	1,519	0,634	0,919	0,955	1,047	1,047	0,919
15	E1 Propenil allil disulfida	1,544	0,747	1,082	1,125	1,297	1,233	1,083
16	2 Propenil 1 propenil disulfida	1,547	0,477	0,692	0,719	0,809	0,788	0,692
17	Allil propil disulfida	1,587	0,861	1,247	1,296	1,622	1,420	1,248
18	Allil metil trisulfida	1,618	0,836	1,210	1,257	1,624	1,378	1,210
19	Deoksiallin	1,665	2,087	3,018	3,136	3,832	3,436	3,019
20	Allil 2 propentiosulfinat	1,666	1,552	2,245	2,332	2,911	2,556	2,245
21	Trans 1 propenil allil tiosulfinat	1,667	1,283	1,856	1,928	2,282	2,113	1,856
22	1 propenil allil tiosulfinat	1,669	1,207	1,746	1,815	2,180	1,989	1,746
23	2 propen 1 asam sulfinitioat 1 propenil ester	1,671	0,777	1,126	1,170	1,465	1,282	1,126
24	Allisin	1,673	3,974	5,745	5,969	7,693	6,540	5,746
25	Alliin	3,208	8,906	12,872	13,374	17,112	14,652	12,873
26	Sikloallin	3,211	2,317	3,350	3,481	4,242	3,814	3,351
27	Allil trisulfida	3,505	0,691	1,002	1,041	1,302	1,141	1,002
28	3,5 Dietil 1,2,4 tritiolan	4,733	0,681	0,987	1,025	1,214	1,124	0,987
29	Ajoen	7,935	3,399	4,915	5,107	6,444	5,595	4,915
30	Diallil heptasulfida	11,508	1,115	1,614	1,677	1,949	1,838	1,614

Catatan : Senyawa dengan penulisan cetak tebal merupakan senyawa organosulfur yang banyak berperan dalam mengatasi berbagai gangguan kesehatan

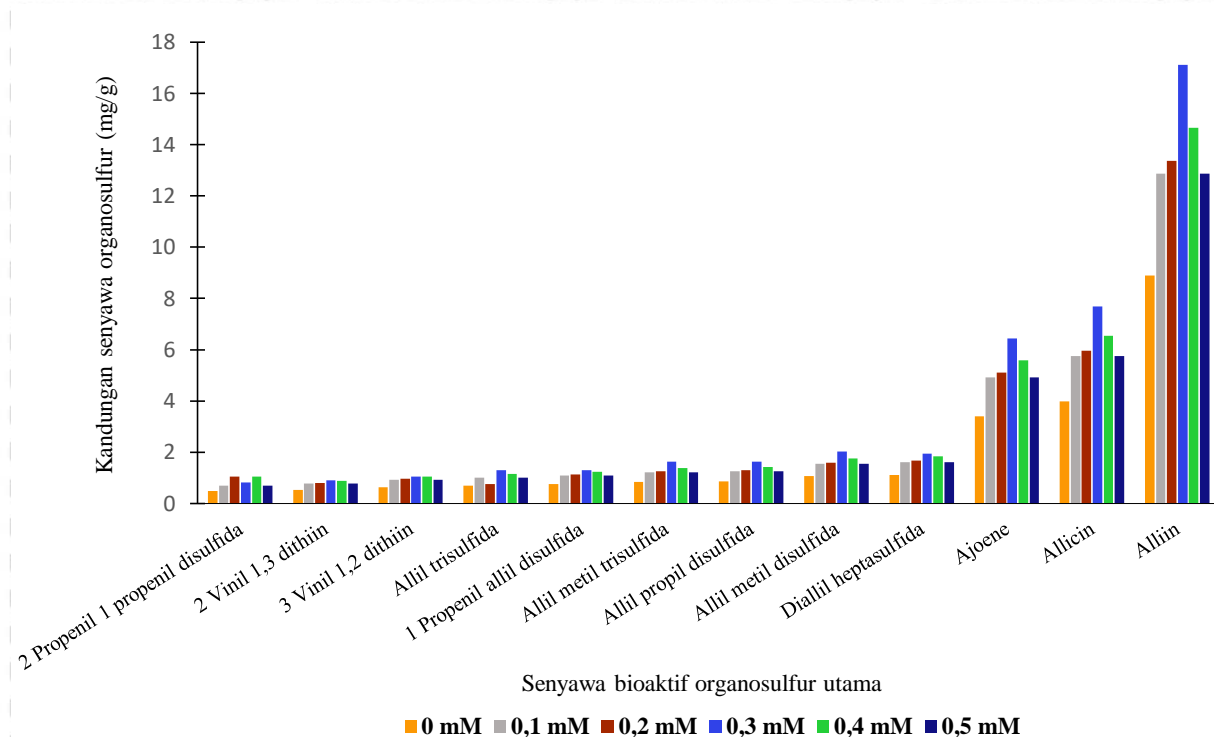
Elisitasi dengan menggunakan logam Fe^{3+} dan Zn^{2+} pada media kultur berpengaruh terhadap kadar senyawa bioaktif organosulfur. Pemberian elisitor Fe^{3+} maupun Zn^{2+} dalam medium kultur mampu meningkatkan kadar senyawa bioaktif organosulfur. Semua jenis senyawa bioaktif organosulfur yang dihasilkan dengan elisitasi menggunakan Fe^{3+} mengalami peningkatan dengan semakin bertambahnya konsentrasi elisitor (Gambar 18). Konsentrasi Fe^{3+} tertinggi (0,5 mM) dapat meningkatkan senyawa organosulfur paling tinggi dibandingkan dengan konsentrasi yang lebih rendah. Kadar beberapa senyawa bioaktif organosulfur yang dihasilkan pada elisitasi 0,5 mM Fe^{3+} antara lain, alliin, allisin dan ajoene (masing-masing 11,98; 5,35; 4,57 mg/g) meningkat sekitar 1,5 kali lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol (masing-masing 8,90; 3,97; 3,39 mg/g). Senyawa lainnya yaitu 2 propenil 1 propenil disulfida; 2 vinil 1,3 dithiin; 3 vinil 2,2 dithiin; allil trisulfida; allil metil disulfida dan diallil heptasulfida juga mengalami peningkatan yang sama dibandingkan dengan kontrol.



Gambar 18. Pengaruh elisitor Fe^{3+} terhadap kadar senyawa bioaktif organosulfur utama dalam suspensi sel bawang putih tunggal

Pemberian elisitor Zn^{2+} pada medium kultur juga meningkatkan senyawa bioaktif organosulfur. Elisitor Zn^{2+} mampu meningkatkan kadar senyawa organosulfur pada kultur suspensi sel lebih tinggi dibandingkan elisitor Fe^{3+} . Kadar beberapa senyawa bioaktif

organosulfur yang dihasilkan pada medium dengan penambahan 0,3 mM Zn^{2+} antara lain, alliin, Allisin dan ajoen (masing-masing 17,11; 7,69; 6,44 mg/g) meningkat sekitar 2 kali lebih tinggi dibandingkan dengan medium tanpa pemberian Zn^{2+} . Pada konsentrasi Zn^{2+} yang lebih tinggi yaitu 0,4 dan 0,5 mM, kadar senyawa bioaktif organosulfur mengalami sedikit penurunan (Gambar 19). Hal tersebut menunjukkan bahwa konsentrasi optimum dari masing-masing elisitor dalam meningkatkan kadar senyawa bioaktif organosulfur adalah berbeda.



Gambar 19. Pengaruh elisitor Zn^{2+} terhadap kadar senyawa bioaktif organosulfur utama dalam suspensi sel bawang putih tunggal

Kultur suspensi sel menjadi metode yang efektif dalam produksi senyawa bioaktif (Atanasov *et al.*, 2015; Ochoa-Villarreal, 2016). Strategi untuk meningkatkan produksi senyawa bioaktif dengan metode kultur suspensi adalah dengan pemberian elisitor. Logam merupakan salah satu elisitor abiotik yang dapat digunakan untuk meningkatkan senyawa bioaktif tanaman. Logam Fe^{3+} dan Zn^{2+} telah terbukti dapat meningkatkan produksi senyawa bioaktif pada beberapa tanaman (Wang & Wu, 2013). Peran ion logam dalam meningkatkan senyawa bioaktif dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain spesies tanaman, jenis dan konsentrasi logam (Verma & Shukla, 2015; Maleki, 2017). Elisitor Fe^{3+} dan Zn^{2+} dilaporkan

juga mampu meningkatkan beberapa jenis senyawa bioaktif tanaman. Elisitor Fe^{3+} mampu meningkatkan produksi senyawa bioaktif Betalain 2 kali lebih tinggi pada kultur sel *Bougenvillea* dengan konsentrasi 0,1 mM (Lachotia *et al.*, 2014) dan mampu meningkatkan red pigmen 8x lebih tinggi pada kultur sel *Cartamus tinctorius* dengan konsentrasi 0,3 mM (Chavan, 2010). Elisitor Zn^{2+} mampu meningkatkan produksi senyawa bioaktif sulforaphane 3 kali lebih tinggi pada kultur sel *Lepidium draba* (Mohammadi *et al.*, 2014) dan xanthotoxin 2 kali lebih tinggi pada kultur sel *Ammi majus* elisitasi dengan 0,2 mM Zn^{2+} (Katara *et al.*, 2014).

Elisitor berperan sebagai molekul sinyal, dan elisitasi dimulai dengan adanya persepsi sinyal oleh reseptor spesifik yang terdapat pada membran sel, yang diikuti dengan inisiasi transduksi sinyal dan selanjutnya mengaktivasi ekspresi faktor transkripsi pada gen-gen yang berperan pada jalur metabolisme untuk peningkatan sintesis dan akumulasi senyawa bioaktif. Stress yang ditimbulkan akibat pemberian logam akan menyebabkan beberapa perubahan kimia, fisiologis dan morfologis dalam pertumbuhan, fotosintesis, sintesis protein, metabolisme lipid, respirasi serta perubahan metabolisme sekunder (Sharma & Dietz, 2009; Karuppusamy, 2009). Elisitor dapat dikenali oleh reseptor membentuk kompleks elisitor-reseptor. Reseptor yang teraktivasi akan menyebabkan pengaktifan efektor seperti terjadinya fluks ion, Ca^{2+} burst, ROS burst, pengasaman sitoplasma, aktivasi NADPH oksidase, aktivasi G-protein dan fosforilasi *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) (Zhao, 2005). Efektor yang teraktivasi selanjutnya akan meningkatkan sintesis molekul pensinyalan (asam salisilat, asam jasmonat, metil jasmonat, oksida nitrat, dll.). Molekul pensinyalan akan mengaktivasi gen-gen untuk faktor transkripsi dan selanjutnya faktor transkripsi akan mengaktivasi gen-gen untuk enzim yang berperan dalam jalur biosintesis senyawa bioaktif (Blume *et al.*, 2000).

Pengenalan elisitor Fe^{3+} dan Zn^{2+} reseptor akan menyebabkan terbentuknya ROS. Dalam meningkatkan produksi ROS, logam Fe^{3+} akan bereaksi secara langsung melalui reaksi Haber-Weiss atau reaksi Fenton, sedangkan logam Zn^{2+} terlebih dahulu akan berikatan dengan senyawa lain yang mempunyai gugus aktif sulfhidril (-SH) (Sharma & Dietz, 2009). Dalam mengatasi kelebihan produksi ROS, sel tanaman mensintesis enzim-enzim antioksidan seperti antioksidan non-enzimatik, salah satunya yaitu glutathione (Mittler, 2002). Selain berperan sebagai antioksidan, glutathione juga berperan dalam biosintesis senyawa organosulfur S-allil-sistein sulfoksida atau alliin. Alliin yang terbentuk merupakan parental untuk senyawa bioaktif

organosulfur lainnya (Jones *et al.*, 2004). Dengan diinduksinya glutation dalam proses elisitasi Fe^{3+} dan Zn^{2+} , maka akan terjadi peningkatan senyawa organosulfur.

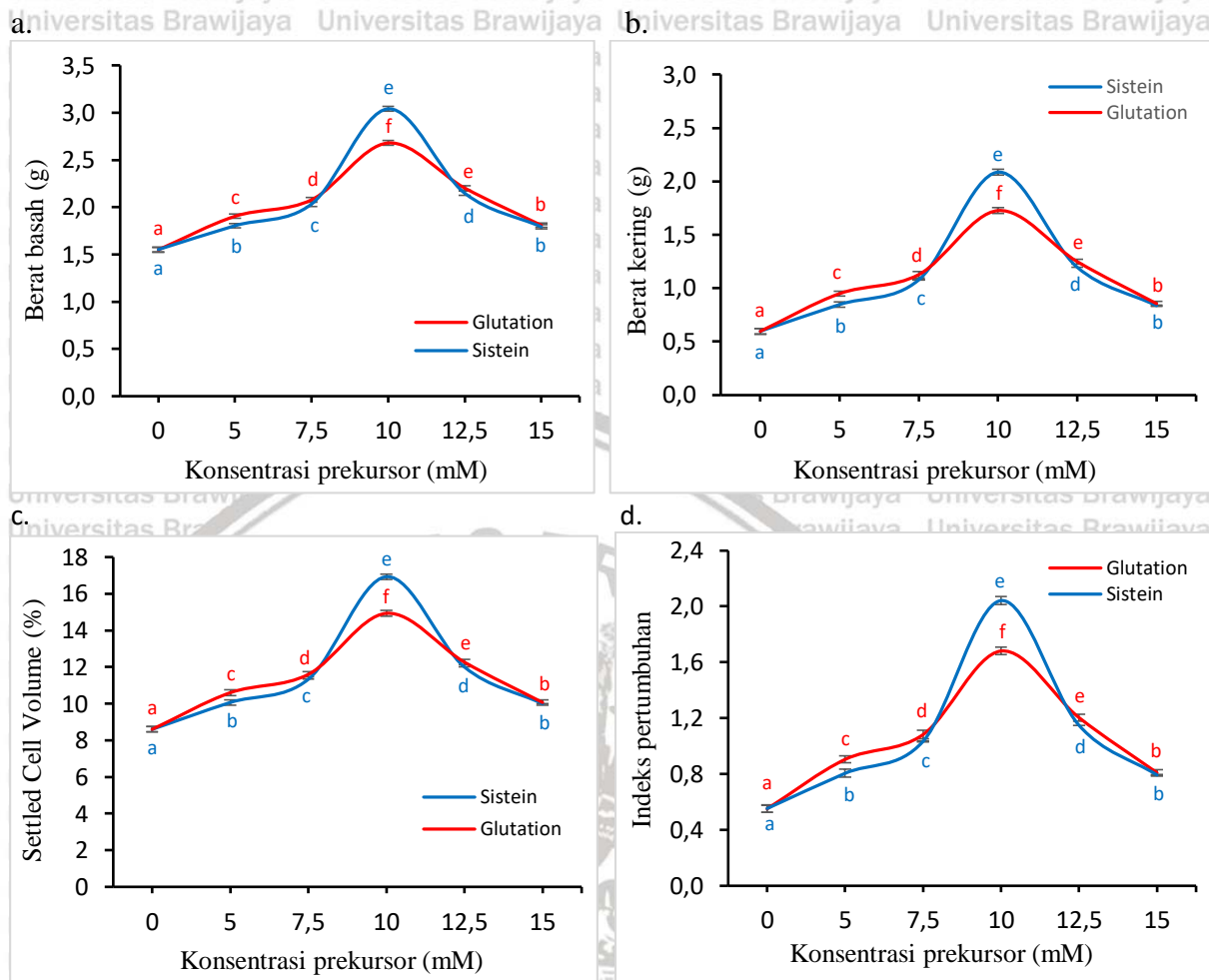
4.5 Pengaruh Pemberian Prekursor Glutathion dan Sistein Terhadap Pertumbuhan

Kultur Suspensi Sel Bawang Putih Tunggal

Glutathion dan sistein sebagai *prekursor feeding* yang ditambahkan pada medium kultur berpengaruh terhadap pertumbuhan kultur suspensi sel bawang putih tunggal. Pemberian glutathion dan sistein meningkatkan berat basah, berat kering, *settled cell volume* dan indeks pertumbuhan kultur suspensi sel bawang putih tunggal, dengan pola peningkatan yang sama pada semua parameter pertumbuhan suspensi sel (Gambar 20). Pertumbuhan kultur suspensi sel mengalami peningkatan mulai konsentrasi 5 mM dan mencapai maksimum pada konsentrasi 10 mM, serta mengalami penurunan pada konsentrasi 12.5 mM dan 15 mM (Gambar 2). Pemberian glutathion pada media kultur pada konsentrasi dibawah dan diatas 10 mM menghasilkan pertumbuhan kultur suspensi sel yang lebih tinggi dibandingkan dengan pemberian sistein, sedangkan pada konsentrasi 10 mM pemberian sistein menghasilkan pertumbuhan kultur suspensi sel yang lebih tinggi dibandingkan dengan pemberian glutathion.

Pemberian 10 mM glutathion maupun sistein pada media kultur, menghasilkan berat basah sel tertinggi masing-masing 2,68 g dan 3,04 g. Glutathion mampu meningkatkan kurang lebih 1,7 kali lipat berat basah sel, sedangkan sistein mampu meningkatkan 2 kali lipat berat basah sel dibandingkan pada medium tanpa perlakuan (Gambar 20a). Berat kering sel hasil pemberian prekursor glutathion dan sistein juga meningkat hingga maksimum pada konsentrasi 10 mM. Glutathion 10 mM mampu meningkatkan berat kering sel 3 kali lipat dibandingkan dengan kontrol, sedangkan sistein mampu meningkatkan berat kering sel hampir 3,5 kali lipat dibandingkan dengan kontrol (Gambar 20b).

Settled cell volume menyatakan fraksi volume sel dalam 30 ml kultur. Pada media kultur yang tidak dilakukan pemberian prekursor, fraksi volume sel adalah sebesar 8,6%. Konsentrasi 10 mM dari kedua prekursor masing-masing memberikan hasil *settled cell volume* 14,9% untuk pemberian glutathion dan 16,9% untuk pemberian sistein (Gambar 20c). Indeks pertumbuhan juga mengalami peningkatan pada konsentrasi 10 mM. Prekursor glutathion mampu meningkatkan 3 kali lipat sedangkan prekursor sistein mampu meningkatkan lebih tinggi yaitu hampir 4 kali lipat dibandingkan kontrol (Gambar 20d).



Gambar 20. Pengaruh konsentrasi glutathion dan sistein pada pertumbuhan biomassa dalam kultur sel suspensi bawang putih tunggal. (a) berat basah. (b) berat kering. (c) *settled cell volume*. (d) indeks pertumbuhan. Keterangan : huruf kecil yang sama pada perlakuan perbedaan konsentrasi prekursor glutathion dan sistein menunjukkan tidak beda nyata pada uji Beda Nyata Terkecil (BNT) pada taraf ketelitian 0,05.

Glutathion merupakan tripeptida (γ -glutamyl-cysteine-glycine) dengan gugus tiol, yang mempunyai peran sebagai pengatur utama redoks seluler. Kondisi redoks seluler adalah mediator penting dari beberapa proses sel seperti pertumbuhan, proliferasi dan diferensiasi sel.

Menurut Ogawa (2005) dan Nahar *et al.* (2015), glutathion berperan dalam memodulasi terjadinya proliferasi sel, pertumbuhan, perkembangan, siklus sel, ekspresi gen dan aktivitas protein. Lebih lanjut Kerk *et al.* (1995) menyatakan bahwa pada fase awal siklus sel (G1), sel memiliki kandungan glutathion yang sangat rendah (Kerk *et al.*, 1995), dan kurangnya ketersediaan glutathion pada fase ini dapat menyebabkan siklus sel terhenti (Potter *et al.*, 2004). Pada regulasi proliferasi sel, glutathion terlibat dalam keberlangsungan siklus sel.

Sequestering glutathion dalam nukleus terjadi pada fase awal siklus proliferasi sel. Glutathion di dalam nukleus berpengaruh pada proses transkripsi gen, antara lain dengan pembelahan sel, regulasi redoks serta regulasi faktor transkripsi. Glutathion yang terdistribusi ke dalam nukleus menyebabkan berkurangnya akumulasi glutathion yang ada dalam sitoplasma, padahal ketersediaan glutathion pada nukleus dan sitoplasma dalam keadaan seimbang sangat diperlukan selama siklus sel berlangsung (Diaz-Vivancos *et al.* 2010, 2015; Schnaubelt *et al.* 2015). Dengan pemberian glutathion, akan terjadi peningkatan jumlah glutathion yang diperlukan sel untuk bisa berkembang dari fase awal (G1) menuju fase (S) (Kerk & Feldman, 1995). Pemberian glutathion juga berpengaruh pada produksi hormon sitokinin endogen, zat pengatur tumbuh yang berperan dalam mendorong terjadinya pembelahan sel pada jaringan meristematik. Dilaporkan oleh Synkova *et al.* 2004, adanya sitokinin berlebih terdeteksi pada tanaman dengan aktivitas enzim glutathion dan askorbat yang tinggi. Pengaruh pemberian glutathion telah dilaporkan antara lain mampu meningkatkan perkembangbiakan kalus sebesar 2x lipat dibanding kontrol pada mikropropagasi *Phoenix dactylifera* L (Al-Mayahi *et al.*, 2020), meningkatkan jumlah dan panjang tunas pada morfogenesis *Spilanthes calva* L. (Shankar *et al.* 2012), dan memacu embriogenesis somatik pada *Picea glauca* (Stasolla C, *et al.*, 2004).

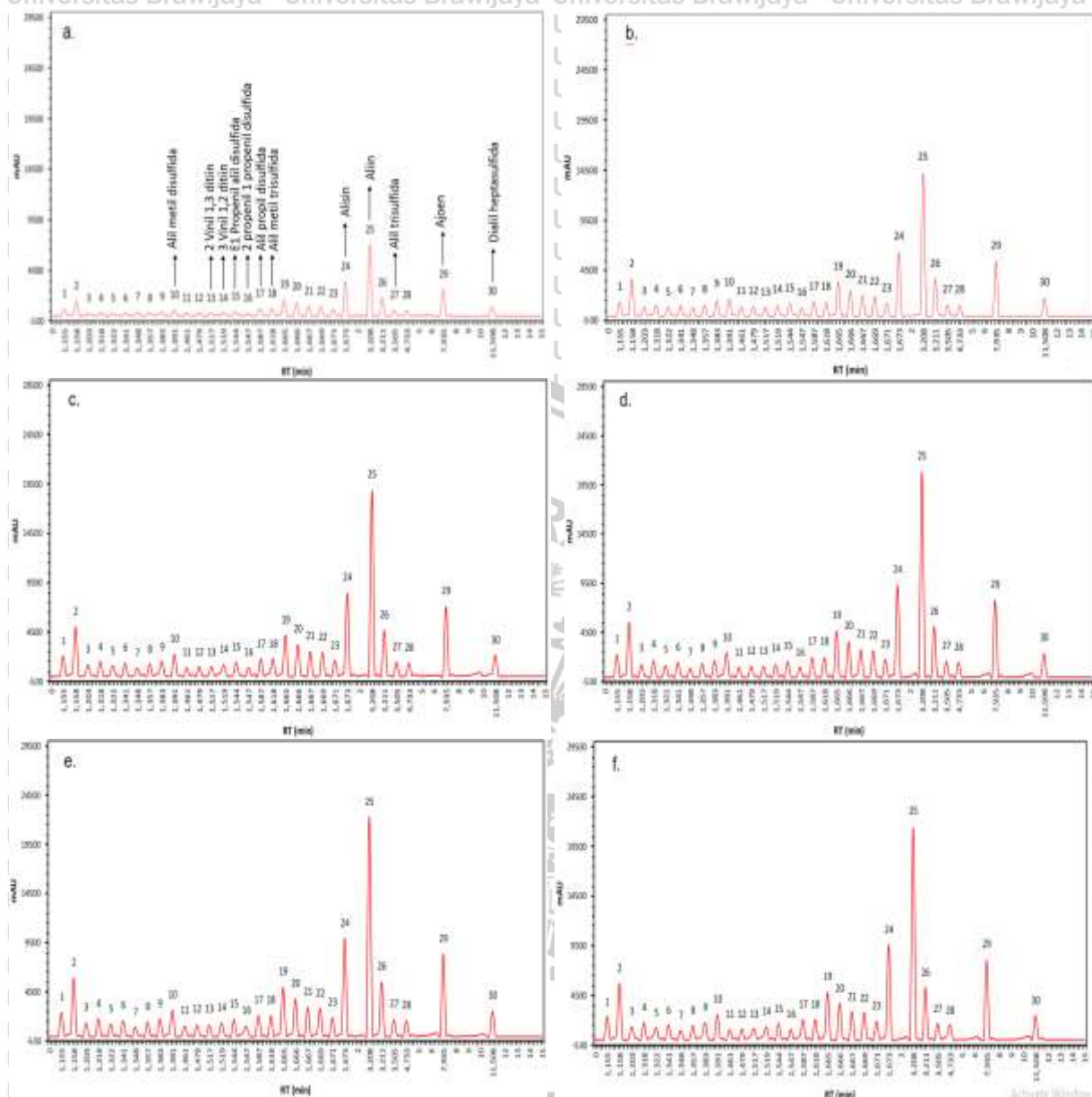
Sistein berfungsi sebagai prekursor untuk beberapa biomolekul penting, antara lain antioksidan seperti glutathion (Mullineaux & Rausch, 2005), vitamin dan kofaktor (Droux, 2004; Wirtz & Droux, 2005), sintesis beberapa senyawa pertahanan seperti glucosinolates, thionins or phytoalexins (Rausch & Wachter, 2005), serta beberapa senyawa metabolit sekunder (Yakhin *et al.*, 2017; Shekari & Jamal, 2017). Semua biomolekul tersebut mengandung gugus belerang yang bertindak sebagai gugus fungsi dan berasal dari sistein. Pemberian prekursor sistein dalam media kultur dapat meningkatkan pembelahan sel sehingga memiliki potensi terhadap peningkatan pertumbuhan sel. Hal ini disebabkan karena sistein mempunyai peran sebagai sumber nitrogen organik dalam metabolisme tumbuhan dan penyusunan protein untuk pembentukan sel. Kakkar *et al.* (2000) menyatakan bahwa asam amino mempunyai peran dalam mempertahankan struktur protein yang dibutuhkan untuk pembelahan sel. Sistein secara tidak langsung juga berkontribusi pada sintesis hormon pertumbuhan. Ketersediaan sistein sangat diperlukan dalam sintesis glutathion, karena glutathion ikut berperan pada produksi hormon sitokinin endogen, ZPT yang berperan mendorong

terjadinya pembelahan sel pada jaringan meristematik (Synkova *et al.*, 2004). Beberapa penelitian pemberian sistein telah dilaporkan, antara lain pemberian 1 mM sistein mampu meningkatkan pembentukan somatik embriogenesis 20% lebih tinggi dibandingkan kontrol pada kultur kalus *Saccharum officinarum*. L (Asad *et al.*, 2009), pemberian 10 ppm sistein mampu menginduksi pembentukan kalus embrionik pada kultur *Salacca sumatrana*. Becc (Elimasni *et al.*, 2018).

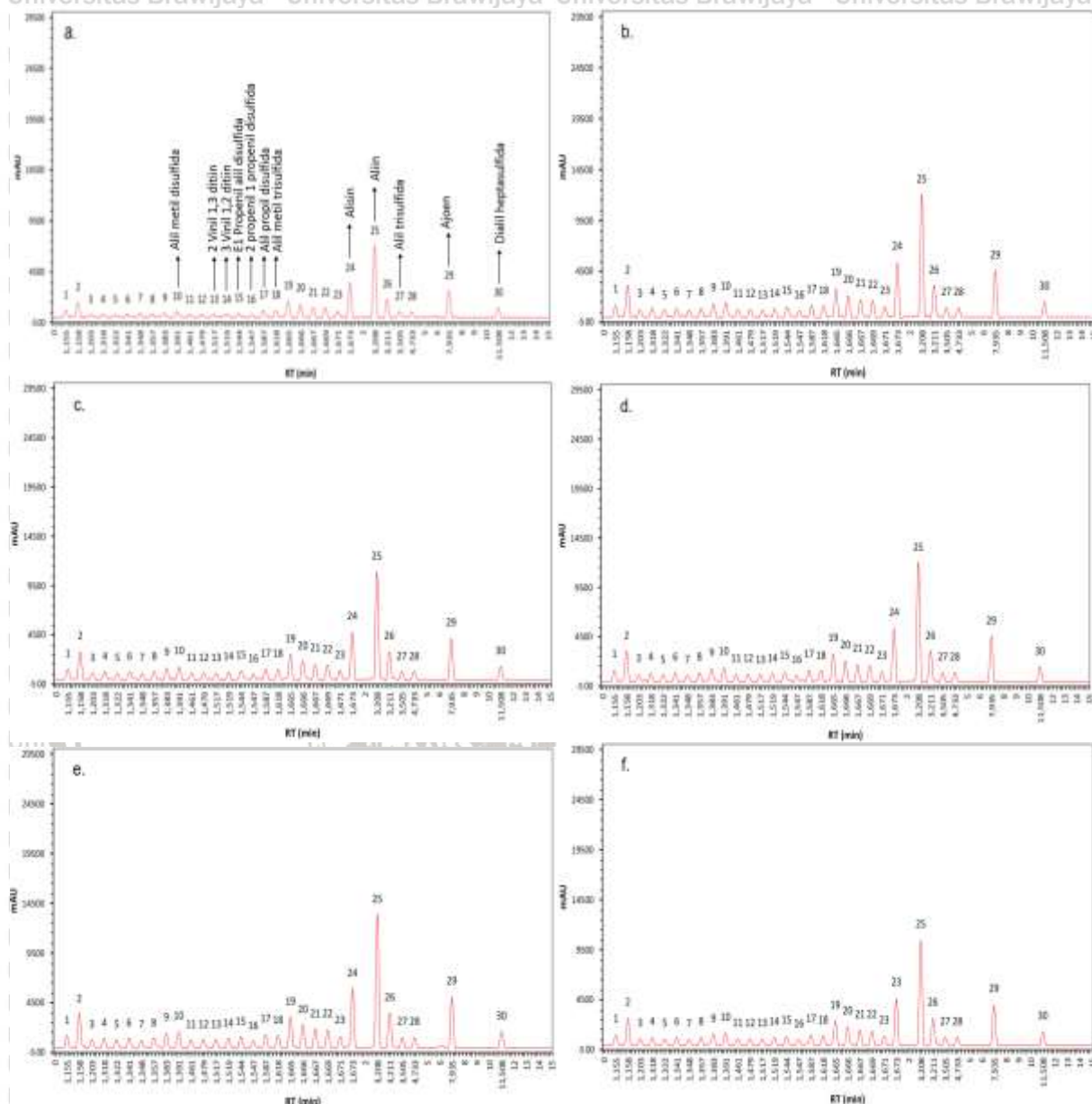
Pemberian prekursor glutation dan sistein pada media kultur berkontribusi dalam menstimulasi pertumbuhan ketika diterapkan pada level yang sesuai dengan level fisiologis. Ghaosheng & Jingming (2012) menyatakan bahwa pemberian prekursor feeding dengan konsentrasi yang terlalu tinggi dapat menghambat pertumbuhan sel dan aktivitas enzim yang dapat menjadi racun bagi sel.

4.6 Pengaruh Pemberian Prekursor Glutathion dan Sistein Terhadap Produksi Senyawa Bioaktif Organosulfur pada Kultur Suspensi Sel Bawang Putih Tunggal

Kromatogram analisis HPLC menunjukkan bahwa sel suspensi bawang putih baik yang diberi atau tidak diberi prekursor teridentifikasi 30 jenis senyawa organosulfur. Perbedaan kadar senyawa bioaktif organosulfur pada setiap senyawa untuk masing-masing konsentrasi glutathion dan sistein digambarkan dengan adanya perbedaan luas area puncak setiap senyawa. Dari 30 jenis senyawa tersebut, terdapat 12 senyawa organosulfur utama yang mempunyai manfaat penting untuk kesehatan yaitu alliin, Allisin, ajoen, kelompok dithiin (2 vinil 1,3 dithiin; 3 vinil 1,2 dithiin) dan kelompok allil sulfide (2 propenil 1 propenil disulfida; 1 propenil allil disulfida; allil metil disulfida; allil propil disulfida; allil trisulfida; allil metil trisulfida; diallil heptasulfida). Dari 12 senyawa tersebut, senyawa alliin, Allisin dan ajoen merupakan penanda terhadap bau dan rasa pada bawang putih tunggal (Gambar 21;22).



Gambar 21. Kromatogram HPLC senyawa bioaktif organosulfur dalam suspensi sel bawang putih tunggal dengan penambahan glutation (a). 0mM; (b). 5mM; (c). 7,5mM; (d). 10mM; (e). 12,5mM; (f). 15mM



Gambar 22. Kromatogram HPLC senyawa bioaktif organosulfur dalam suspensi sel bawang putih tunggal dengan penambahan sistein (a). 0mM; (b). 5mM; (c). 7,5mM; (d). 10mM; (e). 12,5mM; (f). 15mM

Tiga puluh macam senyawa organosulfur dengan kadar senyawa bioaktif organosulfur yang dihasilkan pada perlakuan pemberian glutathion disajikan pada Tabel 11. Waktu retensi dari masing-masing senyawa komponen sampel suspensi sel dalam melewati kolom menuju detektor sama dengan waktu retensi pada perlakuan elisitasi. Senyawa yang terdeteksi pertama kali adalah 1,2 Epitiopropan dengan waktu retensi 1,155 menit, sedangkan senyawa yang terakhir terdeteksi adalah diallil heptasulfida dengan waktu retensi 11,580 menit. Senyawa bioaktif organosulfur menunjukkan kadar yang bervariasi pada setiap konsentrasi perlakuan

pemberian glutation. Pada suspensi sel tanpa perlakuan pemberian prekursor, kadar senyawa organosulfur yang dihasilkan bervariasi antara 0,539 mg/g (3 metil 2 siklolopentena 1 tion dan 2 propenil 1 propenil disulfida) sampai 9,884 mg/g (alliin). Pada konsentrasi 12,5 mM pemberian prekursor glutation memberikan hasil tertinggi pada kadar semua senyawa bioaktif organosulfur dengan bervariasi antara 1,317 mg/g (2,5 dimetiltetrahidrotiopen) sampai 30,902 mg/g (alliin). Alliin, allisin, ajoen dan diallil heptasulfida menghasilkan kadar lebih tinggi dibandingkan dengan senyawa organosulfur lainnya (masing-masing 30,902; 13,896; 11,641; 3,524 mg/g).

Sebanyak 30 senyawa bioaktif organosulfur menunjukkan kadar yang bervariasi pada setiap konsentrasi perlakuan pemberian sistein (Tabel 12). Pada konsentrasi 12,5 mM pemberian prekursor sistein juga memberikan hasil tertinggi pada kadar semua senyawa bioaktif organosulfur yang bervariasi antara 0,978 mg/g (2 propenil 1 propenil disulfida) sampai 18,153 mg/g (alliin). Alliin, allisin, ajoen dan diallil heptasulfida menghasilkan kadar lebih tinggi dibandingkan dengan senyawa organosulfur lainnya (masing-masing 18,153; 8,104; 6,933; 2,279 mg/g).

Tabel 11. Macam dan kandungan senyawa organosulfur pada suspensi sel bawang putih tunggal dengan perlakuan prekursor **glutation**

Nomer puncak	Senyawa	Waktu retensi (RT)	Konsentrasi (mg/g) BB pada perlakuan glutatone					
			0	5	7,5	10	12,5	15
1	1,2 Epitioopropan	1,155	0,985	1,874	2,969	3,222	3,385	3,277
2	Allil merkaptan	1,158	2,118	4,942	7,191	7,803	8,196	7,935
3	Dimetil disulfida	1,203	0,412	1,194	1,681	1,824	1,917	1,856
4	2,5 Dimetiltiopen	1,318	0,461	1,420	2,180	2,365	2,485	2,406
5	3 Metil 2 siklopentena 1 tion	1,322	0,359	1,168	1,543	1,675	1,760	1,704
6	Isobutil isotiosianat	1,341	0,464	1,430	1,935	2,099	2,206	2,136
7	2,5 Dimetiltetrahidrotiopen	1,348	0,566	1,068	1,155	1,254	1,317	1,275
8	Propil disulfida	1,357	0,462	1,431	1,798	1,952	2,051	1,985
9	1,3 Dithian	1,383	0,567	2,080	2,188	2,375	2,494	2,415
10	Allil metil disulfida	1,391	0,828	2,294	3,227	3,502	3,679	3,562
11	2,3,4 Tritiapentana	1,461	0,411	1,188	1,285	1,394	1,465	1,418
12	1,2 Dimercaptosiklopentana	1,479	0,413	1,221	1,412	1,531	1,609	1,557
13	2 Vinil 4H 1,3 ditiin	1,517	0,415	1,150	1,414	1,538	1,617	1,564
14	3 Vinil 4H 1,2 ditiin	1,519	0,460	1,373	1,662	1,804	1,900	1,834
15	E1 Propenil allil disulfida	1,544	0,566	1,616	2,058	2,233	2,346	2,271
16	2 Propenil 1 propenil disulfida	1,547	0,359	1,033	1,286	1,395	1,466	1,419
17	Allil propil disulfida	1,587	0,982	1,861	2,573	2,792	2,933	2,840
18	Allil metil trisulfida	1,618	0,986	1,806	2,576	2,795	2,937	2,844
19	Deoksiallin	1,665	2,236	4,500	6,074	6,591	6,923	6,703
20	Allil 2 propentiosulfinat	1,666	1,805	3,348	4,615	5,008	5,261	5,093
21	Trans 1 propenil allil tiosulfinat	1,667	1,403	2,768	3,620	3,928	4,126	3,995
22	1 propenil allil tiosulfinat	1,669	1,339	2,605	3,458	3,752	3,942	3,816
23	2 propen 1 asam sulfinotioat 1 propenil ester	1,671	0,881	1,680	2,324	2,522	2,650	2,565
24	Allisin	1,673	4,806	8,563	12,192	13,229	13,896	13,454
25	Alliin	3,208	9,884	19,182	27,115	29,421	30,902	29,919
26	Sikloalliin	3,211	2,550	4,994	6,725	7,297	7,665	7,421
27	Allil trisulfida	3,505	0,777	1,495	2,066	2,242	2,356	2,280
28	3,5 Dietil 1,2,4 tritiolan	4,733	0,722	1,473	1,927	2,092	2,197	2,127
29	Ajoen	7,935	3,696	7,326	10,214	11,083	11,641	11,270
30	Diallil heptasulfida	11,508	1,347	2,408	3,091	3,354	3,524	3,412

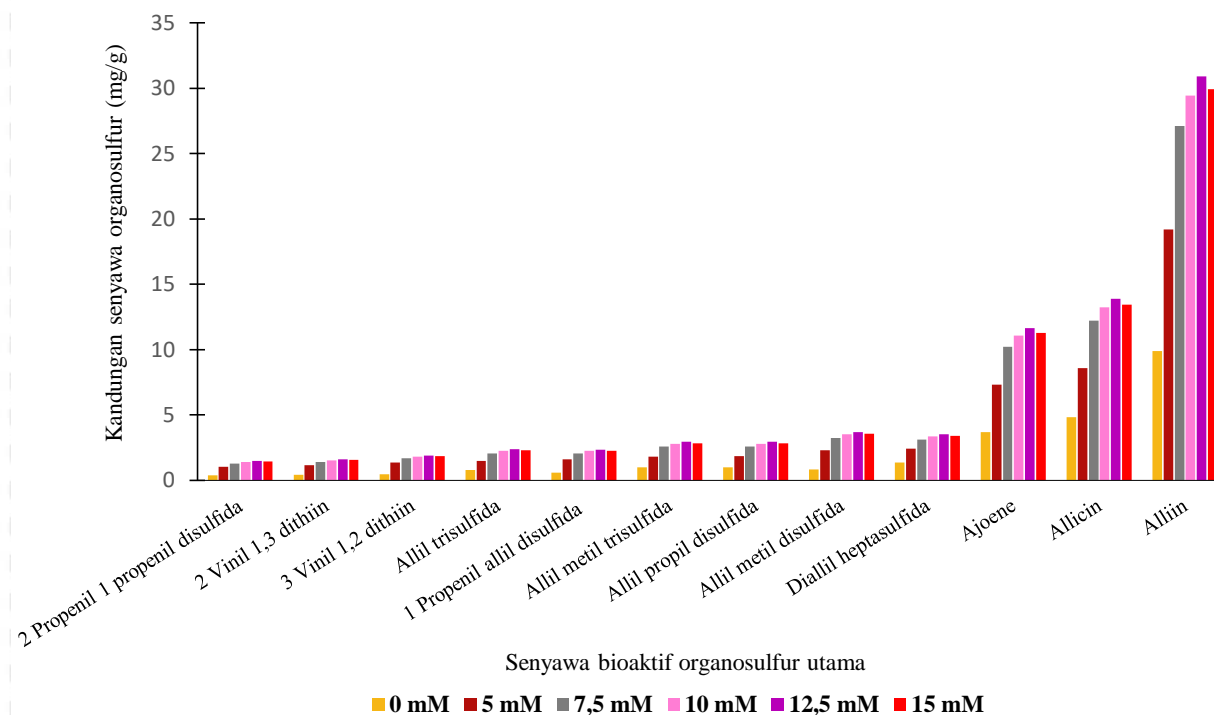
Catatan : Senyawa dengan penulisan cetak tebal merupakan senyawa organosulfur yang banyak berperan dalam mengatasi berbagai gangguan kesehatan

Tabel 12. Macam dan kandungan senyawa organosulfur pada suspensi sel bawang putih tunggal dengan perlakuan prekursor sistein

Nomer puncak	Senyawa	Waktu retensi (RT)	Konsentrasi (mg/g) BB pada perlakuan sistein					
			0	5	7,5	10	12,5	15
1	1,2 Epitiopropan	1,155	0,985	1,518	1,623	1,711	1,736	1,399
2	Allil merkaptan	1,158	2,118	4,007	4,324	4,514	4,620	3,734
3	Dimetil disulfida	1,203	0,412	0,967	1,044	1,090	1,116	0,901
4	2,5 Dimetiltiopen	1,318	0,461	1,150	1,242	1,296	1,327	1,072
5	3 Metil 2 siklolopentena 1 tion	1,322	0,359	0,946	1,022	1,066	1,105	0,882
6	Isobutil isotiosianat	1,341	0,464	1,158	1,250	1,305	1,353	1,079
7	2,5 Dimetiltetrahidrotiopen	1,348	0,566	0,865	0,934	0,974	1,010	0,806
8	Propil disulfida	1,357	0,462	1,160	1,252	1,307	1,354	1,080
9	1,3 Dithian	1,383	0,567	1,686	1,820	1,900	1,969	1,571
10	Allil metil disulfida	1,391	0,828	1,859	2,007	2,095	2,171	1,732
11	2,3,4 Tritiapentana	1,461	0,411	0,962	1,039	1,084	1,124	0,896
12	1,2 Dimercaptosiklopentana	1,479	0,413	0,989	1,068	1,115	1,155	0,921
13	2 Vinil 4H 1,3 ditiin	1,517	0,415	0,931	1,005	1,049	1,088	0,868
14	3 Vinil 4H 1,2 ditiin	1,519	0,460	1,112	1,200	1,253	1,298	1,036
15	E1 Propenil allil disulfida	1,544	0,566	1,309	1,413	1,475	1,529	1,220
16	2 Propenil 1 propenil disulfida	1,547	0,359	0,837	9,03	0,943	0,978	0,779
17	Allil propil disulfida	1,587	0,982	1,508	1,628	1,700	1,761	1,405
18	Allil metil trisulfida	1,618	0,986	1,463	1,579	1,648	1,709	1,363
19	Deoksiallin	1,665	2,236	3,649	3,938	4,110	4,259	3,400
20	Allil 2 propentiosulfinat	1,666	1,805	2,714	2,929	3,057	3,168	2,529
21	Trans 1 propenil allil tiosulfinat	1,667	1,403	2,244	2,422	2,528	2,619	2,091
22	1 propenil allil tiosulfinat	1,669	1,339	2,112	2,279	2,379	2,465	1,968
23	2 propen 1 asam sulfinoat 1 propenil ester	1,671	0,881	1,362	1,470	1,534	1,590	1,269
24	Allisin	1,673	4,806	6,944	7,494	7,822	8,104	6,471
25	Alliin	3,208	9,884	15,557	16,786	17,522	18,153	14,497
26	Sikloallin	3,211	2,550	4,050	4,370	4,561	4,727	3,774
27	Allil trisulfida	3,505	0,777	1,211	1,308	1,365	1,415	1,129
28	3,5 Dietil 1,2,4 tritiolan	4,733	0,722	1,193	1,288	1,345	1,394	1,112
29	Ajoen	7,935	3,696	5,940	6,411	6,692	6,933	5,536
30	Diallil heptasulfida	11,508	1,347	1,952	2,107	2,199	2,279	1,819

Catatan : Senyawa dengan penulisan cetak tebal merupakan senyawa organosulfur yang banyak berperan dalam mengatasi berbagai gangguan kesehatan

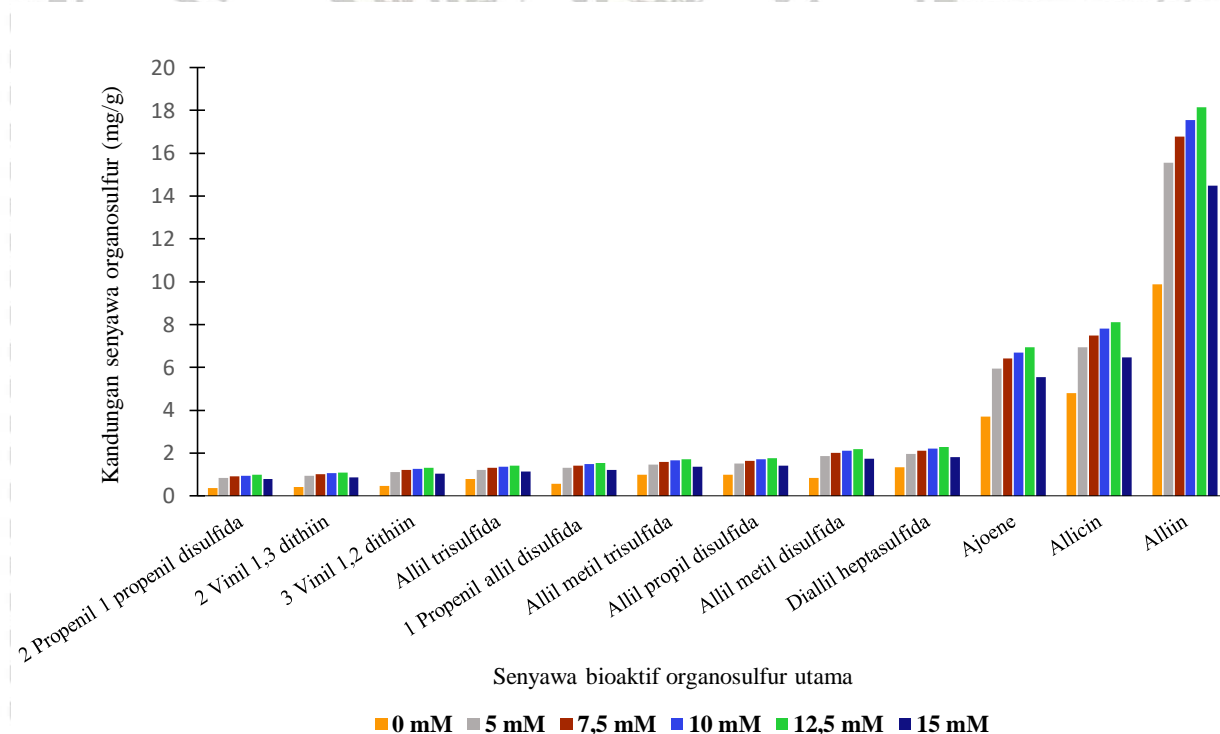
Pemberian glutathione pada medium kultur memberikan pengaruh terhadap peningkatan kadar 12 senyawa bioaktif organosulfur tersebut. Kadar senyawa bioaktif organosulfur mengalami peningkatan pada pemberian glutathione 5 mM hingga 15 mM, dan kadar tertinggi dihasilkan pada pemberian prekursor glutathione 12,5 mM (Gambar 23).



Gambar 23. Pengaruh glutathione terhadap kadar senyawa bioaktif organosulfur utama dalam suspensi sel bawang putih tunggal

Pada kultur suspensi, senyawa alliin, allisin dan ajoen mempunyai kadar yang lebih tinggi dibandingkan dengan senyawa organosulfur lainnya. Ada peningkatan signifikan pada 3 senyawa utama organosulfur tersebut pada suspensi sel akibat pemberian prekursor glutathione, dengan peningkatan tertinggi pada pemberian prekursor 12,5 mM. Pada kontrol, kadar senyawa alliin, allisin dan ajoen (masing-masing 9.88; 4.81; 3,70 mg/g) dan meningkat sekitar lebih dari 3x lipat pada pemberian prekursor konsentrasi 12.5 mM (masing-masing 30.90; 13.90; 11.64 mg/g). Pola peningkatan senyawa organosulfur lain, yaitu 2 propenil 1 propenil disulfida; 2 vinil 1,3 dithiin; 3 vinil 2,2 dithiin; allil trisulfida; allil metil disulfida dan diallil heptasulfida pada pemberian prekursor mempunyai pola yang hampir sama tetapi dengan peningkatan sedikit lebih rendah yaitu sebesar 2x lipat dibandingkan kontrol.

Pemberian sistein pada medium kultur memberikan pengaruh terhadap peningkatan kadar 12 senyawa bioaktif organosulfur utama. Kadar senyawa bioaktif organosulfur mengalami peningkatan pada pemberian sistein 5 mM hingga 12,5 mM, dan mulai menurun pada konsentrasi diatas 12,5 mM hingga 15 mM (Gambar 24). Pada kultur suspensi, senyawa alliin, allisin dan ajoen mempunyai kadar yang lebih tinggi dibandingkan dengan senyawa organosulfur lainnya. Ada peningkatan signifikan pada 3 senyawa utama organosulfur tersebut pada suspensi sel akibat pemberian prekursor sistein, dengan peningkatan tertinggi pada pemberian prekursor 12.5 mM. Pada kontrol, kadar senyawa alliin, allisin dan ajoen (masing-masing 9,88; 4,81; 3,70 mg/g) dan meningkat 2x lipat pada konsentrasi 12.5 mM (masing-masing 18,15; 8,10; 6,93 mg/g). Senyawa organosulfur lain, yaitu 2 propenil 1 propenil disulfida; 2 vinil 1,3 dithiin; 3 vinil 2,2 dithiin; allil trisulfida; allil metil disulfida dan diallil heptasulfida mempunyai pola peningkatan yang sama.



Gambar 24. Pengaruh sistein terhadap kadar senyawa bioaktif organosulfur utama dalam suspensi sel bawang putih tunggal

Peningkatan senyawa bioaktif organosulfur pada kultur suspensi sel bawang putih tunggal tidak terlepas dari keterlibatan glutathione dalam biosintesis senyawa organosulfur alliin, yang merupakan parental dari senyawa organosulfur lainnya. Pemberian prekursor glutathione yang terlibat pada jalur biosintesis ke dalam media kultur dapat meningkatkan senyawa organosulfur alliin. Hal ini didasarkan bahwa setiap senyawa yang merupakan perantara yang berada di awal atau di dalam jalur biosintesis metabolit sekunder dapat meningkatkan produk akhir. Pada jalur biosintesis senyawa organosulfur alliin, glutathione berada dibagian hulu dan terlibat pada tahap awal reaksi. Menurut Gaosheng 2012, prekursor yang berada di hulu dapat diubah menjadi senyawa hilir setelah dikatalisis oleh enzim spesifik. Pada reaksi konjugasi antara glutathione dengan asam metakrilat menghasilkan S-2 carboxypropil glutathione, enzim glutathione transferase (GSTU24) diprediksi mengkatalis terjadinya reaksi tersebut. S-2 carboxypropil glutathione yang meningkat pada tahap awal reaksi akan berpengaruh terhadap peningkatan produk pada tahap reaksi selanjutnya, dan meningkatkan senyawa organosulfur sebagai produk akhir. Stimulasi yang diberikan pada jalur metabolisme dalam kultur sel tanaman dapat memproduksi senyawa bioaktif dengan peningkatan yang signifikan (Wang *et al.* 2001).

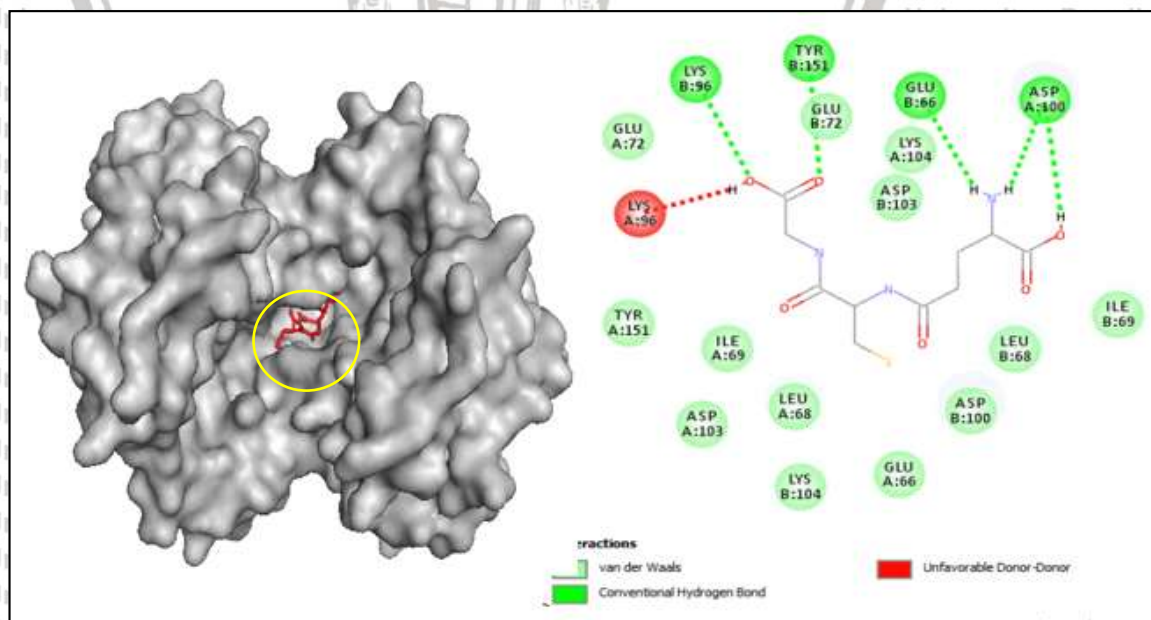
4.7 Visualisasi Molekuler Docking pada Biosintesis Senyawa Organosulfur

Peran glutathione sebagai prekursor dalam meningkatkan senyawa bioaktif organosulfur pada kultur suspensi dapat diprediksi dengan melakukan molekuler docking antara ligan dan enzim yang mengkatalis terjadinya reaksi sebagai protein target. Jalur biosintesis yang memungkinkan dalam pembentukan alliin (sebagai parental dari senyawa organosulfur lainnya) dari glutathione meliputi beberapa tahapan reaksi, yaitu konjugasi glutathione, penghilangan gugus glikil dan modifikasi kelompok S-alk(en)yl, penghilangan gugus γ -glutamil, dan S-oksigenasi yang masing-masing dikatalisis oleh enzim yang spesifik (Yoshimoto, 2019). Glutathione transferase U24 (GSTU24) diprediksi mengkatalis konjugasi glutathione dan asam metakrilat menjadi S-2 carboxypropil glutathione. Dixon *et al.*, (2010) dan Obeidat *et al.*, (2017) melaporkan bahwa enzim glutathione S-transferase tanaman memiliki peran yang beragam dalam metabolisme endogen, salah satunya merupakan enzim yang mengkatalis konjugasi glutathione. Pelepasan gugus glikil pada S-2 carboxypropil glutathione menjadi γ -glutamil-S-allilcysteine diprediksi dikatalis oleh glutathione- γ -

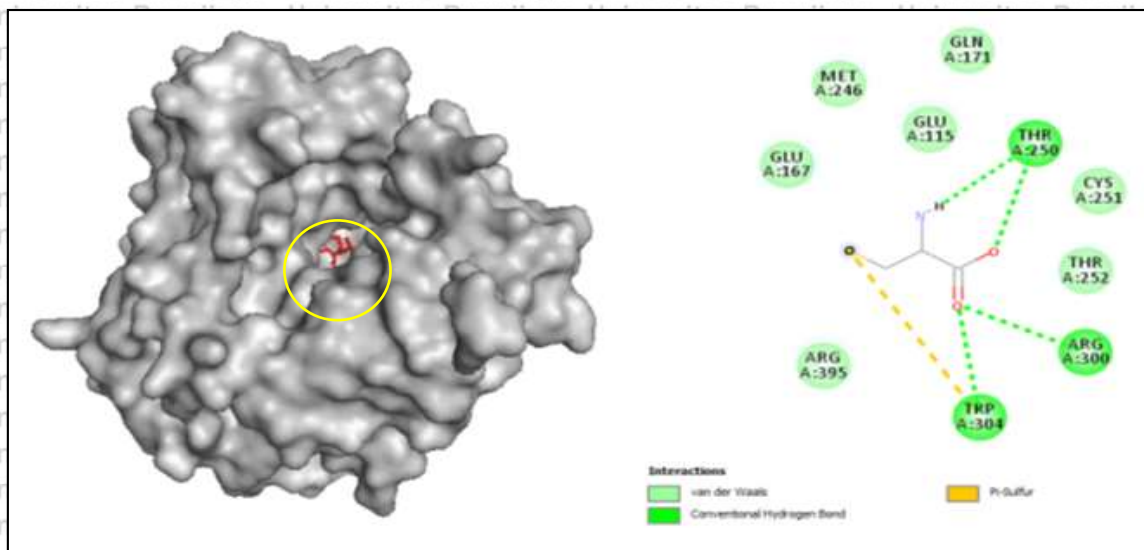
glutamylcysteinyltransferase (AT5G44070), sedangkan pelepasan gugus glutamil pada γ -glutamyl-S-allilcysteine kemungkinan dikatalis oleh γ -glutamyltranspeptidase (AsGGT1).

AsFMO1 yang merupakan gen penyandi flavin mono oksigenase diprediksi mengkatalis S-allilcysteine menghasilkan alliin. Konversi alliin menjadi allil sulfenat dan aminoakrilat diprediksi dikatalis oleh alliin lyase.

Interaksi antara prekursor glutathion sebagai ligan dengan GSTU24 sebagai protein target dapat dilihat dengan terbentuknya kompleks antara keduanya (Gambar 25). Hasil molekular docking menunjukkan bahwa pada reaksi awal terjadi interaksi dengan terbentuknya kompleks antara glutathion dengan GSTU24. Interaksi dapat dilihat dengan terikatnya glutathion pada sisi aktif dari GSTU24. Interaksi terjadi dengan adanya ikatan hidrogen dan van der Waals pada residu-residu asam amino yang mengikat glutathion pada sisi aktif pengikatan. Interaksi antara prekursor sistein sebagai ligan dengan GSH1 sebagai protein target dapat dilihat dengan terbentuknya kompleks antara keduanya (Gambar 26). Hasil molekular docking menunjukkan bahwa pada reaksi awal terjadi interaksi terbentuknya kompleks antara sistein dengan GSH1. Interaksi dapat dilihat dengan terikatnya sistein pada sisi aktif dari GSH1. Interaksi terjadi dengan adanya ikatan hidrogen dan van der Waals pada residu-residu asam amino yang mengikat sistein pada sisi aktif pengikatan.



Gambar 25. Kompleks yang terbentuk antara ligan glutathion (merah) - reseptor GSTU24 (abu-abu) dan ikatan yang terjadi pada interaksi antara ligan - reseptor.



Gambar 26. Kompleks yang terbentuk antara ligan sistein (merah) - reseptor GSH1 (abu-abu) dan ikatan yang terjadi pada interaksi antara ligan – reseptor.

Secara *in silico*, glutation sebagai prekursor dapat dilihat pada visualisasi molekular docking antara glutation dengan GSTU24. Glutation dan asam metakrilat dapat terikat pada sisi aktif GSTU24 melalui ikatan hidrogen dan interaksi van der Waals, dengan afinitas pengikatan masing-masing sebesar -6.5 dan -4.6 kcal/mol. Interaksi tersebut lebih didominasi oleh ikatan hidrogen yang lebih kuat dibandingkan dengan ikatan yang lain. Terbentuknya kompleks dengan pengikatan glutation dan asam metakrilat pada GSTU24, maka glutation yang diberikan berpotensi menjadi substrat GSTU24 untuk menghasilkan S-2 carboxypropil glutation yang merupakan substrat atau ligan untuk tahap reaksi selanjutnya.

Sistein terikat pada sisi aktif GSH1 melalui ikatan hidrogen dan interaksi van der Waals, dengan afinitas pengikatan sebesar -4.5 kcal/mol. Interaksi tersebut juga didominasi oleh ikatan hidrogen yang lebih kuat dibandingkan dengan ikatan yang lain. Terbentuknya kompleks dengan pengikatan sistein pada GSH1, maka sistein berpotensi menjadi substrat GSH1 untuk menghasilkan γ -glutamil sistein yang merupakan ligan untuk tahap reaksi selanjutnya.

4.8 Korelasi Pertumbuhan Kultur Suspensi Sel Bawang Putih Tunggal dengan Kadar

Senyawa Bioaktif Organosulfur pada Perlakuan Elisistasi

Korelasi pertumbuhan kultur suspensi sel dengan kadar senyawa bioaktif organosulfur menggambarkan besarnya kontribusi dari indeks pertumbuhan kultur suspensi sel terhadap

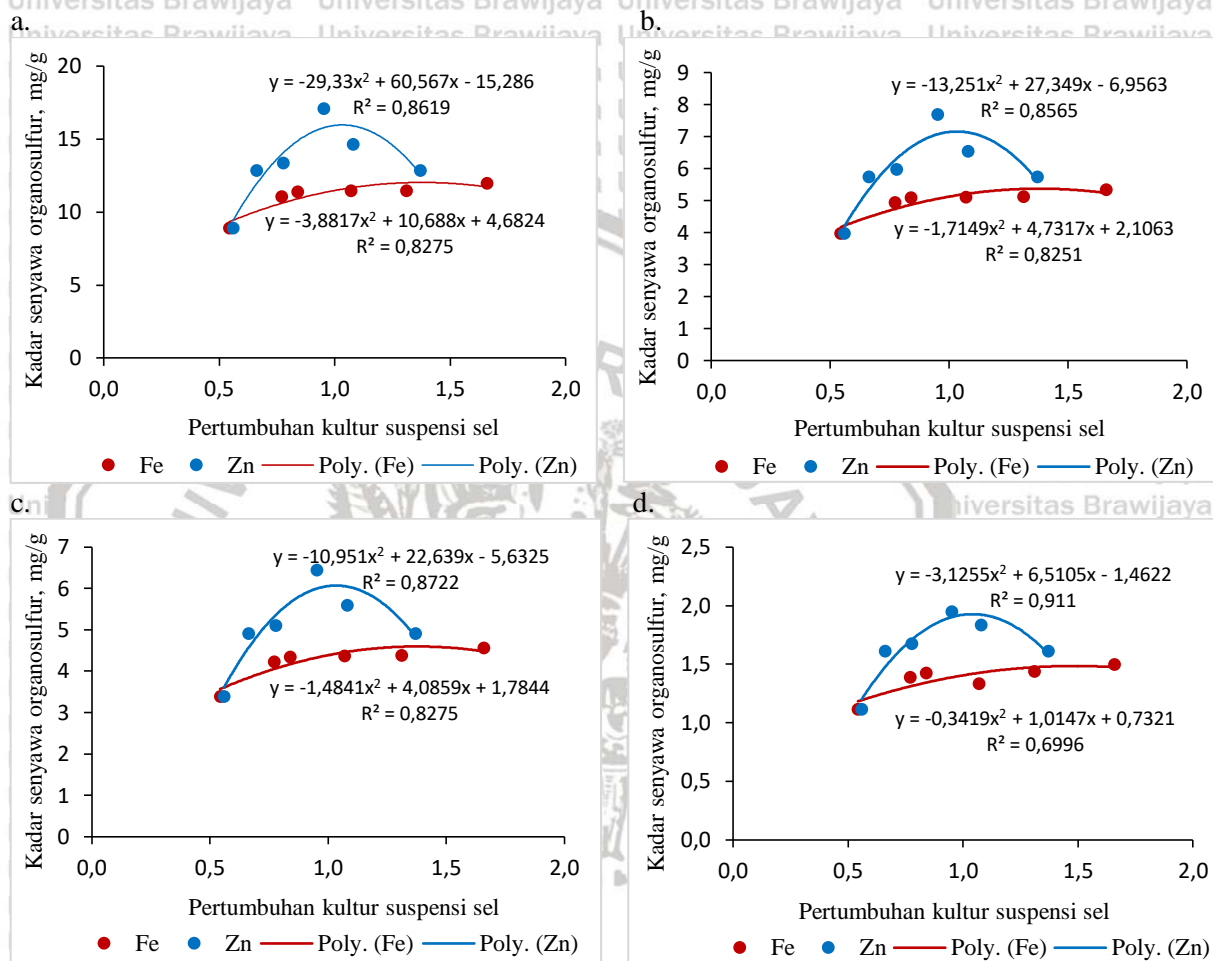
kadar senyawa bioaktif organosulfur pada perlakuan pemberian elisitor Fe^{3+} dan Zn^{2+} (Gambar 27). Ada korelasi pertumbuhan kultur suspensi sel dan kadar senyawa bioaktif pada senyawa bioaktif organosulfur yang mempunyai kadar tertinggi, yaitu alliin (Gambar 27.a), allisin (Gambar 27.b), ajoen (Gambar 27.c) dan diallil heptasulfida (Gambar 27.d).

Pada perlakuan elisitasi menggunakan Fe^{3+} dan Zn^{2+} , pertumbuhan kultur suspensi sel meningkat dengan semakin bertambahnya konsentrasi elisitor. Kadar senyawa bioaktif organosulfur hasil perlakuan Fe^{3+} juga meningkat dengan semakin bertambahnya konsentrasi elisitor. Berbeda dengan perlakuan elisitor Fe^{3+} , senyawa bioaktif organosulfur hasil perlakuan Zn^{2+} meningkat sampai konsentrasi 0,3 mM dan menurun pada konsentrasi diatas 0,3 mM. Korelasi pertumbuhan kultur suspensi sel dengan kadar senyawa bioaktif organosulfur hasil perlakuan elisitasi menggunakan logam Zn^{2+} menghasilkan nilai determinasi atau *R square* yang lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan elisitasi menggunakan logam Fe^{3+} . Senyawa alliin, allisin, ajoen, dan diallil heptasulfida (masing-masing 0,86; 0,86; 0,87; 0,90), semuanya menunjukkan nilai determinasi yang lebih tinggi pada perlakuan elisitasi menggunakan logam Zn^{2+} . Nilai tersebut berarti bahwa pertumbuhan kultur suspensi sel bawang putih tunggal memberikan pengaruh sebesar 87% (rata-rata) terhadap kadar senyawa bioaktif pada perlakuan elisitasi Zn.

Pertumbuhan sel yang terus meningkat dengan semakin bertambahnya konsentrasi elisitor menggambarkan sel-sel masih aktif membelah. Metabolit primer terbentuk pada fase pertumbuhan sebagai hasil dari metabolisme energi dan pada saat pertumbuhan sel terhenti atau sel sudah tidak membelah lagi, pembentukan metabolit primer juga akan berhenti bergeser ke arah pembentukan metabolit sekunder. Metabolit sekunder adalah senyawa yang tidak diperlukan oleh sel/organisme untuk hidup, tetapi berperan dalam interaksi sel/organisme dengan lingkungannya (Pagare *et al.*, 2015).

Menurut Jasinda *et al.* (2008), produksi metabolit sekunder tidak selalu menunjukkan korelasi positif dengan tingkat maksimal pertumbuhan kultur. Adanya perbedaan elisitor terhadap pola pertumbuhan dan aktivitas metabolisme, maka juga akan berpengaruh pada produksi protein, pigmen fotosintesis, gula, dan tiol non-protein. Glutathion dan sistein termasuk dalam golongan tiol non protein dan terlibat dalam biosintesis senyawa organosulfur. Dengan adanya perbedaan elisitor, maka akan terjadi perubahan pada terbentuknya glutathion dan sistein, sehingga berpengaruh terhadap kelimpahan produksi

senyawa bioaktif organosulfur. Menurut Singh *et al.* (2006) dan Rai & Mehrotra (2008), pengaruh tersebut dapat timbul karena adanya penghambatan berbagai enzim yang terlibat dalam biosintesis senyawa bioaktif melalui gangguan pemanfaatan substrat.

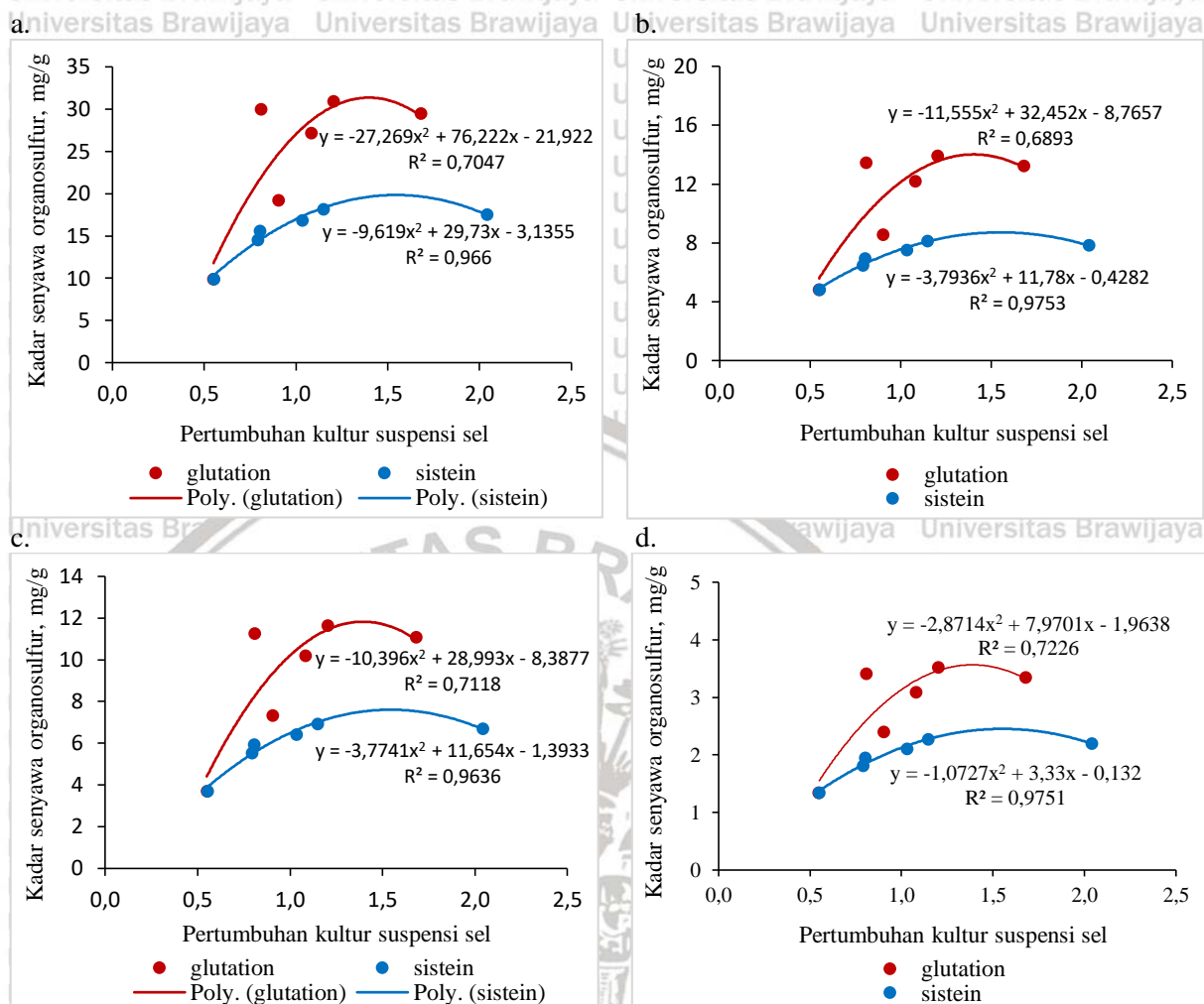


Gambar 27. Korelasi pertumbuhan kultur suspensi sel dengan kadar senyawa bioaktif organosulfur pada perlakuan elisitasi (a). alliin (b). allisin (c). ajoen (d). diallil heptasulfida

4.9 Korelasi Pertumbuhan Kultur Suspensi Sel Bawang Putih Tunggal dengan Kadar Senyawa Bioaktif Organosulfur pada Perlakuan *Precursor Feeding*

Perlakuan *prekursor feeding* glutation dan sistein menunjukkan adanya korelasi pertumbuhan kultur suspensi sel dengan kadar senyawa bioaktif organosulfur (Gambar 28).

Korelasi pertumbuhan kultur suspensi sel dan kadar senyawa bioaktif organosulfur digambarkan pada senyawa bioaktif yang mempunyai kadar tertinggi, yaitu alliin (Gambar 28.a), allisin (Gambar 28.b), ajoen (Gambar 28.c) dan diallil heptasulfida (Gambar 28.d).



Gambar 28. Korelasi pertumbuhan kultur suspensi sel dengan kadar senyawa bioaktif organosulfur pada perlakuan *precursor feeding* (a), alliin (b), allisin (c), ajoen (d), diallil heptasulfida.

Pada perlakuan pemberian prekursor glutathion dan sistein, pertumbuhan kultur suspensi sel hasil perlakuan masing-masing prekursor menunjukkan pola peningkatan dan penurunan yang sama. Peningkatan pertumbuhan kultur suspensi sel terjadi mulai awal pemberian prekursor glutathion maupun sistein, peningkatan pertumbuhan kultur suspensi sel terus meningkat sampai pada konsentrasi 10 mM, dan pertumbuhan mengalami penurunan pada konsentrasi diatas 10 mM hingga 15 mM. Kadar senyawa bioaktif organosulfur hasil perlakuan glutathion dan sistein, masing-masing menunjukkan peningkatan kadar senyawa bioaktif hingga mencapai kadar maksimum pada konsentrasi 12,5 mM. Diatas konsentrasi 12,5 mM hingga 15 mM menunjukkan penurunan kadar senyawa bioaktif. Korelasi pertumbuhan kultur suspensi sel dengan kadar senyawa bioaktif organosulfur hasil perlakuan

pemberian prekursor sistein menghasilkan nilai determinasi atau *R square* yang lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan pemberian prekursor glutation. Senyawa alliin, allisin, ajoen, dan diallil heptasulfida (masing-masing 0,97; 0,98; 0,96; 0,98), semuanya menunjukkan nilai determinasi yang jauh lebih tinggi pada perlakuan pemberian prekursor sistein. Nilai tersebut berarti bahwa pertumbuhan kultur suspensi sel bawang putih tunggal memberikan pengaruh sebesar 97% (rata-rata) terhadap kadar senyawa bioaktif pada perlakuan pemberian prekursor sistein.

Pada pertumbuhan kultur suspensi sel yang mulai mengalami penurunan pada konsentrasi diatas 10 mM, kadar senyawa bioaktif mengalami peningkatan hingga konsentrasi 12,5 mM. Peningkatan maksimum terhadap produksi senyawa bioaktif sejalan dengan terhentinya produksi metabolit primer. Sesuai dengan pernyataan Dixon (2001), bahwa akumulasi metabolit sekunder terjadi lebih banyak selama akhir siklus pertumbuhan kultur. Penurunan kadar senyawa bioaktif diatas konsentrasi 12,5 mM hingga 15 mM disebabkan pada konsentrasi tersebut pertumbuhan sel menurun dengan cepat dan mulai memasuki fase kematian.

4.10 Pembahasan Umum

Tiga bagian tunas bawang putih tunggal yaitu *crown*, tunas tengah dan tunas ujung digunakan sebagai eksplan untuk memperoleh kalus dari eksplan yang dapat memberikan respon terbaik untuk membentuk kalus. Eksplan *crown* bawang putih tunggal yang diinokulasikan pada medium padat Murasighe & Skoog (MS) dengan penambahan ZPT 0,3 ppm 2,4-D dan 0,5 ppm kinetin memberikan respon terbaik dalam induksi kalus dengan persentase pembentukan kalus sebesar 80%, sedangkan eksplan tunas tengah dan ujung tidak mampu membentuk kalus. *Crown* merupakan eksplan terbaik untuk membentuk kalus pada bawang putih tunggal. Jaringan muda yang bersifat meristematik pada eksplan *crown* lebih mudah dalam menghasilkan kalus. Menurut Smith (2013), jaringan muda memiliki kemampuan regenerasi yang tinggi dibandingkan dengan jaringan yang lebih tua. Induksi kalus dari eksplan *crown* juga telah berhasil dilakukan pada kultur kalus *Allium chinense* (Yan *et al.*, 2009), kultur kalus *Allium cepa* (Hailekidan *et al.*, 2013), dan kultur kalus *Allium hirtifolium* (Farhadi *et al.*, 2017). Kultur suspensi sel bawang putih tunggal diinisiasi dari kalus remah yang dikultur dalam medium cair MS dengan ZPT 0,3 ppm 2,4-D dan 0,5 ppm

kinetin. Kalus dengan konsistensi remah sangat bagus digunakan untuk mendapatkan kultur suspensi. Sel-sel di dalam suspensi dapat tumbuh lebih cepat karena semua sel terdistribusi secara merata dalam medium nutrisi. Kultur suspensi sel hasil multiplikasi selanjutnya digunakan pada perlakuan pemberian elisitor dan prekursor.

Elisitasi menggunakan elisitor logam Fe^{3+} dan Zn^{2+} yang ditambahkan pada medium kultur mampu meningkatkan pertumbuhan sel dan kadar senyawa bioaktif organosulfur. Pertumbuhan sel yang meliputi berat basah, berat kering, *Settled Cell Volume*, dan indeks pertumbuhan semakin meningkat dengan bertambahnya konsentrasi elisitor (0,1-0,5 mM). Elisitor Fe^{3+} dan Zn^{2+} memberikan pertumbuhan sel tertinggi pada konsentrasi yang sama yaitu 0,5 mM, tetapi elisitor Fe^{3+} cenderung meningkatkan pertumbuhan sel lebih tinggi dibandingkan dengan Zn^{2+} . Besi dan zink merupakan logam esensial karena besi dan zink berfungsi sebagai kofaktor dalam beberapa proses metabolisme. Besi berperan dalam beberapa proses metabolisme antara lain pembelahan sel, respirasi, fotosintesis, serta biosintesis asam lemak dan asam amino, sedangkan zink antara lain berperan dalam pembelahan sel, sintesis asam nukleat, sintesis protein, fotosintesis, pengaturan metabolisme nitrogen dan sintesis auksin. Besi dapat meningkatkan pertumbuhan sel dengan menstimulasi pembelahan sel-sel meristik. Roschztardt et al. (2011) melaporkan bahwa logam Fe terakumulasi di dalam nukleolus sel tumbuhan dan terlibat dalam biosintesis RNA ribosom (rRNA). rRNA adalah komponen utama penyusun ribosom dan merupakan ribozim yang melakukan sintesis protein.. Demikian pula dengan Zn, di dalam sel logam Zn terakumulasi pada nukleolus (Broadley, 2007). Keterlibatan logam Zn terhadap pertumbuhan sel bergantung pada terjadinya pembelahan sel. Peningkatan jumlah nukleolus merupakan respon terhadap logam Zn yang terlibat dalam sintesis protein (Rout et al., 2009). Sesuai dengan pernyataan Manzano et al. (2013) bahwa proliferasi sel bergantung terus menerus pada suplai protein yang merupakan syarat utama dalam pembelahan sel.

Elisitasi menggunakan elisitor Fe^{3+} dan Zn^{2+} mampu meningkatkan kadar senyawa organosulfur. Analisis HPLC baik pada kontrol maupun perlakuan pemberian elisitor mendeteksi sebanyak 30 macam senyawa organosulfur dan 12 diantaranya merupakan senyawa organosulfur utama (alliin; allisin; ajoen; allil metil disulfida; 2 vinil 1,3 dithiin; 3 vinil 1,2 dithiin; E1 propenil allil disulfida; 2 propenil 1 propenil disulfida; allil propil disulfida; allil metil trisulfida; allil trisulfida; diallil heptasulfida. Elisitor Fe^{3+} dan Zn

meningkatkan kadar senyawa organosulfur dengan pola yang sama pada setiap senyawa organosulfur. Alliin, allisin, ajoen dan dialil heptasulfida terdeteksi mempunyai kadar yang paling tinggi diantara senyawa bioaktif lainnya. Kadar alliin, allisin, ajoen dan dialil heptasulfida hasil perlakuan elisitor Fe^{3+} meningkat maksimum pada konsentrasi 0,5 mM (masing-masing 11,97; 5,35; 4,57; 1,50 mg/g), sedangkan dengan menggunakan Zn^{2+} kadar maksimum dihasilkan pada konsentrasi 0,3 mM (masing-masing 17,11; 7,69; 6,44; 1,95 mg/g). Konsentrasi optimum dari masing-masing elisitor dalam meningkatkan kadar senyawa bioaktif organosulfur menunjukkan perbedaan. Dari kedua jenis elisitor, Zn^{2+} mampu meningkatkan kadar senyawa organosulfur pada kultur suspensi sel lebih tinggi dibandingkan elisitor Fe^{3+} . Elisitor Fe^{3+} 0,5 mM mampu meningkatkan kadar senyawa bioaktif $\pm 1,5$ kali lebih tinggi, sedangkan Zn^{2+} 0,3 mM mampu meningkatkan kadar senyawa ± 2 kali lebih tinggi dibandingkan kontrol.

Pemberian elisitor logam dapat digunakan untuk meningkatkan senyawa bioaktif tanaman. Stress yang ditimbulkan akibat paparan logam akan menyebabkan beberapa perubahan kimia, fisiologis dan morfologis dalam pertumbuhan, fotosintesis, sintesis protein, metabolisme lipid, respirasi serta perubahan metabolisme sekunder (Sharma & Dietz, 2009; Karuppusamy, 2009). Elisitor dapat dikenali oleh reseptor membentuk kompleks elisitor-reseptor. Pengenalan reseptor terhadap elisitor Fe^{3+} dan Zn^{2+} menyebabkan terjadinya ledakan ROS. Logam Fe^{3+} memicu terbentuknya radikal bebas dengan terjadinya reaksi Haber-Weiss atau reaksi Fenton, sedangkan logam Zn^{2+} memicu terbentuknya radikal dengan mengikat senyawa lain yang mempunyai gugus aktif sulfhidril (-SH) (Sharma & Dietz, 2009). Produksi ROS yang berlebih, mengakibatkan sel tanaman mensintesis antioksidan seperti glutathion yang merupakan antioksidan non-enzimatik (Mittler, 2002). Selain berperan sebagai antioksidan, glutathion juga berperan dalam biosintesis senyawa organosulfur dalam menghasilkan alliin. Alliin yang terbentuk merupakan parental untuk senyawa bioaktif organosulfur lainnya (Jones *et al.*, 2004). Dengan diinduksinya glutathion dalam proses elisitasi Fe^{3+} dan Zn^{2+} maka akan terjadi peningkatan senyawa organosulfur.

Precursor feeding glutathion dan sistein yang ditambahkan pada medium kultur mampu meningkatkan pertumbuhan sel dan senyawa bioaktif organosulfur. Pertumbuhan sel (berat basah, berat kering, settled cell volume, indeks pertumbuhan) meningkat pada konsentrasi 5-10 mM, dan menurun pada konsentrasi 12,5-15 mM. Pertumbuhan sel tertinggi dihasilkan

pada perlakuan pemberian prekursor 10 mM, dan prekursor sistein cenderung meningkatkan pertumbuhan sel lebih tinggi dibandingkan prekursor glutation. Pemberian prekursor sistein dapat meningkatkan pembelahan sel yang berpotensi terhadap peningkatan pertumbuhan sel. Hal ini karena sistein mempunyai peran sebagai sumber nitrogen organik dalam metabolisme tumbuhan dan penyusunan protein untuk pembentukan sel. Kakkar *et al.* (2000) menyatakan bahwa asam amino mempunyai peran dalam mempertahankan struktur protein yang dibutuhkan untuk pembelahan sel. Sistein secara tidak langsung juga berkontribusi pada sintesis hormon pertumbuhan. Ketersediaan sistein sangat diperlukan dalam sintesis glutation, yang berpengaruh pada produksi hormon sitokinin endogen, zat pengatur tumbuh yang berperan dalam mendorong terjadinya pembelahan sel pada jaringan meristematik (Synkova *et al.*, 2004).

Precursor feeding glutation dan sistein yang ditambahkan pada medium kultur juga mampu meningkatkan pada kadar senyawa bioaktif organosulfur. Sebanyak tiga puluh (30) senyawa organosulfur terdeteksi dalam analisis menggunakan perangkat HPLC dan 12 diantaranya merupakan senyawa organosulfur utama (alliin, allisin, ajoen, dialil heptasulfida, alil metil disulfida, alil propil disulfida, alil metil trisulfida, 1 propenil alil disulfida, alil trisulfida, 2 vinil 1,3 dithiin; 3 vinil 1,2 dithiin; 2 propenil 1 propenil disulfida). Masing-masing prekursor menunjukkan peningkatan kadar senyawa bioaktif dengan pola yang sama pada setiap senyawa organosulfur. Alliin, allisin, ajoen dan dialil heptasulfida terdeteksi mempunyai kadar yang paling tinggi diantara senyawa bioaktif lainnya. Alliin, allisin, ajoen dan dialil heptasulfida hasil perlakuan pemberian prekursor meningkat maksimum pada konsentrasi 12,5 mM. Pada perlakuan glutation 12,5 mM, peningkatan kadar alliin, allisin, ajoen dan dialil heptasulfida masing-masing sebesar 30,90; 13,89; 11,64; 3,52 mg/g. Pada perlakuan sistein, peningkatan kadar masing-masing sebesar 18,15; 8,10; 6,93; 2,28 mg/g. Glutation mampu meningkatkan kadar senyawa organosulfur ($\pm 3x$ lipat) lebih tinggi dibandingkan dengan sistein ($\pm 2x$ lipat) dibandingkan kontrol.

Pemberian prekursor didasarkan bahwa penambahan senyawa intermediet dari jalur biosintesis senyawa bioaktif pada awal atau selama periode kultur sel, dapat berfungsi sebagai substrat tambahan di dalam meningkatkan senyawa bioaktif (Jackson dan Attalla 2010). Glutation merupakan tripeptida yang terdiri dari sistein, glisin dan asam glutamat. Glutation berperan sebagai prekursor pada tahap awal jalur biosintesis alliin. Glutation berkonjugasi

dengan asam metakrilat menghasilkan senyawa S-2 karboksi propil glutation (Yoshimoto & Saito, 2019) yang diprediksi dikatalis oleh glutation transferase (GSTU24). Peningkatan S-2 karboksi propil glutation yang dihasilkan pada tahap awal reaksi akan meningkatkan produk pada tahap reaksi selanjutnya, dan meningkatkan senyawa organosulfur sebagai produk akhir. Ketersediaan glutation endogen pada kultur suspensi sel dilaporkan lebih rendah dibandingkan dengan glutation yang ada di jaringan yang telah terdeferensiasi, sehingga pemberian glutathione eksogen sebagai prekursor diperlukan untuk meningkatkan produksi senyawa bioaktif organosulfur. Wang *et al.*, (2001) menyatakan bahwa stimulasi pada jalur metabolisme dalam kultur sel tanaman untuk produksi senyawa bioaktif dapat menghasilkan peningkatan yang signifikan terhadap produksi senyawa bioaktif. Sistein juga dapat menjadi prekursor untuk semua senyawa biologis organosulfur termasuk alliin. Sebelum terlibat dalam jalur biosintesis alliin, sistein akan dikonversi terlebih dahulu menjadi γ -glutamil sistein dan selanjutnya dikonversi menjadi glutation (Yamaguchi & Kumagai, 2019). Glutamat sistein ligase (GSH1) diprediksi mengkatalis konversi sistein menjadi γ -glutamil sistein. Sistein yang telah dikonversi menjadi glutation selanjutnya akan terlibat dalam biosintesis alliin. Hal ini menyebabkan produksi senyawa organosulfur dengan perlakuan pemberian glutation lebih tinggi dibandingkan dengan pemberian sistein, karena ketersediaan sistein digunakan terlebih dahulu untuk memproduksi glutation.

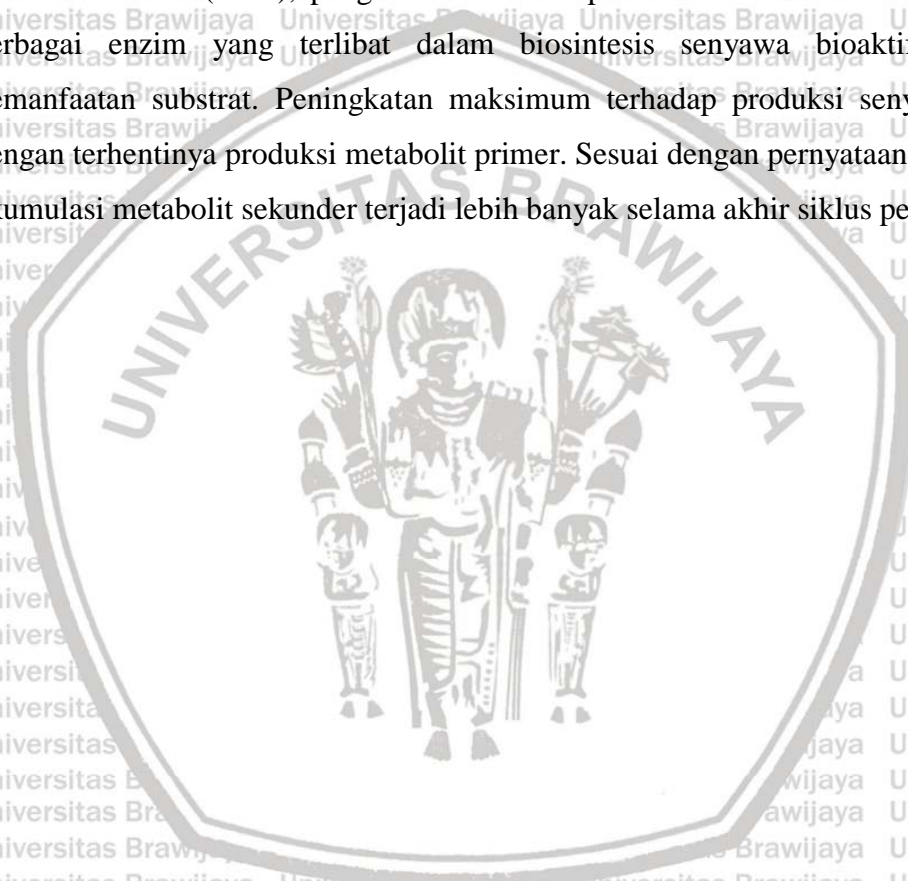
Secara *in siliko*, hasil visualisasi molekular docking menggambarkan terbentuknya kompleks glutation-GSTU24 dan sistein-GSH1. Glutation dapat terikat pada sisi aktif GSTU24 melalui ikatan hidrogen dan interaksi van der Waals, dengan afinitas pengikatan sebesar -6.5. Interaksi lebih didominasi oleh ikatan hidrogen yang lebih kuat dibandingkan dengan ikatan yang lain. Terbentuknya kompleks glutation-GSTU24, berpotensi untuk menghasilkan S-2 karboksi propil glutation yang merupakan substrat atau ligan untuk tahap reaksi selanjutnya. Sistein terikat pada sisi aktif GSH1 melalui ikatan hidrogen dan interaksi van der Waals, tetapi dengan afinitas pengikatan yang lebih rendah, yaitu sebesar -4.5 kcal/mol. Terbentuknya kompleks dengan pengikatan sistein pada GSH1, maka sistein berpotensi untuk menghasilkan γ -glutamil sistein yang merupakan ligan untuk tahap reaksi selanjutnya. Berdasarkan hasil molekular docking glutation-GSTU24 dan sistein-GSH1 menunjukkan bahwa nilai energi ikatan yang terbaik dimiliki oleh glutation.

Korelasi pertumbuhan kultur suspensi sel dengan kadar senyawa bioaktif organosulfur menggambarkan seberapa besar indeks pertumbuhan kultur suspensi sel memberikan kontribusi terhadap kadar senyawa bioaktif organosulfur. Ada korelasi antara pertumbuhan kultur suspensi sel dengan kadar senyawa organosulfur pada perlakuan pemberian elisitor dan perlakuan pemberian prekursor. Pada perlakuan pemberian elisitor, pertumbuhan kultur suspensi sel meningkat dengan semakin bertambahnya konsentrasi elisitor. Kadar senyawa organosulfur hasil perlakuan Fe^{3+} meningkat dengan semakin bertambahnya konsentrasi elisitor, tetapi dengan perlakuan Zn^{2+} kadar senyawa organosulfur meningkat sampai konsentrasi 0,3 mM dan menurun pada konsentrasi diatas 0,3 mM. Korelasi pertumbuhan kultur suspensi sel dengan kadar senyawa organosulfur hasil perlakuan elisitor Zn^{2+} lebih tinggi dibandingkan perlakuan Fe^{3+} . Alliin, allisin, ajoen, dan dialil heptasulfida menunjukkan nilai determinasi lebih tinggi (masing-masing 0,86; 0,86; 0,87; 0,90), yang berarti bahwa pertumbuhan kultur suspensi memberikan kontribusi sebesar 87% (rata-rata) terhadap kadar senyawa organosulfur pada perlakuan elisitor Zn^{2+} .

Pada perlakuan pemberian prekursor, pertumbuhan kultur suspensi sel menunjukkan pola peningkatan dan penurunan yang sama. Pertumbuhan kultur suspensi sel meningkat pada konsentrasi prekursor 5-10 mM, dan menurun pada konsentrasi diatas 10 mM hingga 15 mM. Kadar senyawa bioaktif organosulfur hasil perlakuan prekursor meningkat pada konsentrasi prekursor 5-12,5 mM, dan menurun pada konsentrasi 15 mM. Korelasi pertumbuhan kultur suspensi sel dengan kadar senyawa organosulfur hasil perlakuan pemberian sistein lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan pemberian glutathione. Alliin, allisin, ajoen, dan dialil heptasulfida (masing-masing 0,97; 0,98; 0,96; 0,98), menunjukkan nilai determinasi yang jauh lebih tinggi pada perlakuan pemberian sistein. Pertumbuhan kultur suspensi sel memberikan kontribusi sebesar 97% (rata-rata) terhadap kadar senyawa organosulfur pada perlakuan pemberian sistein.

Pertumbuhan sel yang terus meningkat dengan semakin bertambahnya konsentrasi elisitor dan prekursor menggambarkan sel-sel masih aktif membelah. Metabolit primer terbentuk pada fase pertumbuhan sebagai hasil dari metabolisme energi, dan pada saat pertumbuhan sel berhenti maka pembentukan metabolit primer juga akan berhenti dan bergeser ke arah pembentukan metabolit sekunder. Menurut Jasinda *et al.* (2008), produksi metabolit sekunder tidak selalu menunjukkan korelasi positif dengan tingkat maksimal pertumbuhan

kultur. Adanya perbedaan elisitor dan prekursor terhadap pola pertumbuhan dan aktivitas metabolisme, maka juga akan berpengaruh pada produksi protein, pigmen fotosintesis, gula, dan tiol non-protein. Glutation dan sistein termasuk dalam golongan tiol non protein dan berperan dalam biosintesis senyawa organosulfur. Dengan adanya perbedaan elisitor, maka akan terjadi perubahan pada terbentuknya glutathione dan sistein, sehingga berpengaruh terhadap kelimpahan produksi senyawa bioaktif organosulfur. Menurut Singh *et al.* (2006) dan Rai & Mehrotra (2008), pengaruh tersebut dapat disebabkan karena adanya penghambatan berbagai enzim yang terlibat dalam biosintesis senyawa bioaktif melalui gangguan pemanfaatan substrat. Peningkatan maksimum terhadap produksi senyawa bioaktif sejalan dengan terhentinya produksi metabolit primer. Sesuai dengan pernyataan Dixon (2001), bahwa akumulasi metabolit sekunder terjadi lebih banyak selama akhir siklus pertumbuhan kultur.



BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Eksplan *crown* pada media MS + ZPT 2,4-D 0,3 ppm dan kinetin 0,5 ppm memberikan respon terbaik dalam pembentukan kalus dengan persentase 80%, sedangkan eksplan tunas tengah dan ujung tidak mampu membentuk kalus. Kalus yang dihasilkan mempunyai tekstur remah sehingga sesuai digunakan untuk inisiasi kultur suspensi sel.

Elisitasi dengan Fe^{3+} dan Zn^{2+} dapat meningkatkan pertumbuhan kultur suspensi sel dan kadar senyawa bioaktif organosulfur. Elisitor Fe^{3+} cenderung meningkatkan pertumbuhan kultur suspensi sel lebih tinggi dibandingkan Zn^{2+} , sebaliknya elisitor Zn^{2+} meningkatkan kadar senyawa bioaktif organosulfur lebih tinggi dibandingkan Fe^{3+} . Indeks pertumbuhan tertinggi diperoleh pada perlakuan elisitor Fe^{3+} 0,5 mM. Akumulasi senyawa bioaktif organosulfur tertinggi diperoleh pada perlakuan elisitor Zn^{2+} 0,3 mM (2x lipat dibandingkan kontrol).

Pemberian prekursor glutation dan sistein dapat meningkatkan pertumbuhan kultur suspensi sel dan kadar senyawa bioaktif organosulfur. Sistein cenderung meningkatkan pertumbuhan kultur suspensi sel lebih tinggi dibandingkan glutation, sebaliknya glutation meningkatkan kadar senyawa organosulfur yang lebih tinggi dibandingkan sistein. Indeks pertumbuhan tertinggi diperoleh pada kultur suspensi sel dengan perlakuan pemberian sistein 10 mM. Akumulasi senyawa bioaktif organosulfur tertinggi diperoleh pada perlakuan pemberian prekursor glutation 12,5 mM (3x lipat dibandingkan kontrol). Kultur suspensi sel kontrol dan hasil elisitasi dan *precursor feeding* teridentifikasi 30 senyawa organosulfur, 12 diantaranya merupakan senyawa bioaktif organosulfur utama yaitu alliin; allisin; ajoen; allil metil disulfida; 2 vinil 1,3 dithiin; 3 vinil 1,2 dithiin; E1 propenil allil disulfida; 2 propenil 1 propenil disulfida; allil propil disulfida; allil metil trisulfida; allil trisulfida; dan diallil heptasulfida.

Visualisasi molekular docking menunjukkan terbentuknya kompleks glutation-glutation transferase (GSTU24) dan sistein-glutamat sistein ligase (GSH1) dengan afinitas pengikatan masing-masing 6.5 kcal/mol dan -4.5 kcal/mol. Enzim GSTU24 diprediksi mengkatalis

glutation menjadi S-2 karboksi propil glutation, sedangkan glutamat sistein ligase (GSH1) diprediksi mengkatalis sistein menjadi γ -glutamil sistein.

Korelasi pertumbuhan kultur suspensi sel dengan kadar senyawa bioaktif organosulfur hasil elisitasi Zn^{2+} (87%) lebih tinggi dibandingkan elisitasi Fe^{3+} (79%). Korelasi pertumbuhan kultur suspensi sel dengan kadar senyawa bioaktif organosulfur hasil pemberian prekursor sistein (97%) lebih tinggi dibandingkan dengan glutation (71%).

Metode kultur suspensi sel dengan strategi elisitasi dan prekursor feeding mempunyai potensi meningkatkan produksi senyawa bioaktif organosulfur yang bermanfaat penting dalam bidang kesehatan.

5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk penambahan elisitor dan *precursor feeding* terbaik secara bersama, yaitu kombinasi antara elisitor Zn^{2+} 0,3 mM dengan *precursor feeding* glutation 12,5 mM. Pada penelitian ini belum dilakukan kajian tentang mekanisme elisitor logam Fe^{3+} dan Zn^{2+} dalam meningkatkan senyawa bioaktif organosulfur secara in siliko. Diharapkan pada penelitian selanjutnya dapat ditambahkan atau dilengkapi dengan molekular docking mekanisme elisitor logam dalam meningkatkan senyawa organosulfur

5.3 Rekomendasi

Peningkatan produksi senyawa bioaktif organosulfur dapat dilakukan dengan metode kultur suspensi sel dengan elisitasi menggunakan elisitor Zn^{2+} , dan *precursor feeding* glutation.

DAFTAR PUSTAKA

- Abyari, M., N. Nasr, J. Soorni & D. Sadhu. 2016. Enhanced accumulation of scopoletin in cell suspension culture of *Spilanthes acmella* Murr. using precursor feeding. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 59: e1615053.
- Akinmusire, Omomowo & Usman. 2014. Evaluation of the phytochemical properties and antifungal activities of ethanol extract of *Allium sativum*. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 3(10):143-149.
- Ali, M. & B.H. Abbasi. 2014. Secondary metabolites production and antioxidant activity in cell suspension cultures of *Artemisia absinthium* L. *J. Photochem. Photobiol. B.* 140(0):223-227.
- Al-Jibouri, J.M., S.A. Abed, A.J. Ali & M.D. Mejeed. 2016. Improvement of phenols production by amino acids in callus cultures of *Verbascum thapsus* L. *Am. J. Plant Sci.* 7(7):84-91.
- Al-Mayahi, A.M.W., O.N. Jafar & K.A. Mohsen. 2020. Effect of glutation (GSH) on date palm (*Phoenix dactylifera* L.) micropropagation. *Folia Oecol.* 47(1):64-69.
- Arnault, I., J.P. Christides. N. Mandon, T. Haffner. R. Kahane & J. Auger. 2003. High performance ion-pair chromatography method for simultaneous analysis of alliin, deoxyalliin, allisin and dipeptide precursor in garlic product using multiple mass spectrometry and UV detection. *J. Chromatogr.* 991(1):69-75.
- Asdaq, S.M. & M.N. Inamdar. 2014. Potential of garlic and its active constituent, S-allil cysteine, as antihypertensive and cardioprotective in presence of captopril. *Phytomedicine.* 17(13):1016-1026.
- Asgari-Lajayer, B., Ghorbanpour, M., Nikabadi, S. 2017. Heavy metals in contaminated environment: Destiny of secondary metabolite biosynthesis, oxidative status and phytoextraction in medicinal plants. *Ecotox. Environ. Safe.* 145: 377-390.
- Ashtiani, S.R., T. Hasanloo & M.R. Bihamta. 2005. Enhanced production of silymarin by Ag⁺ elicitor in cell suspension cultures of *Silybum marianum*. *Pharm. Biol.* 48(6):708-715.
- Atanasov, A.G., B. Waltenberger. E.M. Pferschy-Wenzig, T. Linder, C. Wawrosch, P. Uhrin V. Temml, L. Wang, S. Schwaiger, E.H. Heiss, J.M. Rollinger, D. Schuster, J.M. Breuss, V. Bochkov, M.D. Mihovilovic, B. Kopp, R. Bauer, V.M. Dirsch & H. Stuppner. 2015. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnol. Adv.* 33(8): 1582–1614.
- Banerjee, S.K. & S.K. Maulik. 2002. Effect of garlic on cardiovascular disorders : A Review. *Nutr. J.* 1(0):1-14.
- Baserga R. 1984. Growth in size and cell DNA replication, *Exp. Cell Res.* 151:1-5
- Bathia, S. & T. Bera. 2016. Classical and Nonclassical Techniques for Secondary Metabolite Production in Plant Cell Culture. *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences.*
- Bharat, P. 2014. Comparative analytical study of single bulb and multi bulb garlic (*Allium sativum* Linn.). *Int. J. Ayurveda & Altern. Med.* 2(4):86-91.
- Bigeard, J., J. Colcombet & H. Hirt. 2015. Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity (PTI). *Mol. Plant.* 8(4):521-539.
- Block, E. 1985. The chemistry of garlic and onion. *SciAm.* 252(3):114-119.
- Block, E., S. Naganatan, D. Putman & S.H. Zhao. 1992. Allium chemistry: HPLC analysis of thiosulfinates from onion, garlic, wild garlic (Ramsoms), leek, scallion, shalot, elephant



- (graet-headed) garlic, chive, and chinese chive. Unique high allil to metil ratios in some garlic samples. *J. Agric. Food Chem.*, 40:2418-2430.
- Blume, B., T. Nurnberger, N. Nass & D. Scheel. 2000. Receptor-mediated increase in cytoplasmic free calcium required for activation of pathogen defense in parsley. *The Plant Cell*, 12(8): 1425–1440.
- Borlinghaus, J., F. Albrecht, H. Gruhlke, D.I. Nwachukwu & J.A. Slusarenko. 2014. Chemistry and Biological Properties, *J. Mol.* 19(8):12591-12618.
- Broadley M. R., P.J. White, J.P. Hammond, I. Zelko & A. Lux. 2007. Zinc in plants, *New Phytol.* 173:677-702.
- Bunrathep, S., G.B. Lockwood, T. Songsak & N. Ruangrunsi. 2006. Chemical constituents from leaves and cell cultures of *Pogostemon cablin* and use of precursor feeding to improve patchouli alcohol level. *Sci. Asia.* 32(3):293-296.
- Castillo-González J, D. Ojeda-Barrios, A. Hernández-Rodríguez, A.C. González-Franco, L. Robles-Hernández, López-Ochoa & G. Rogelio. 2018. Zinc metalloenzymes in plants, *Interciencia*, 43:4
- Castro, F., Q. Braga, M. Sousa, C. Coimbra & R. Chagas. 2016. Callus induction and bioactive phenolic compounds production from *Byrsonima verbascifolia* (L.) DC. (Malpighiaceae). *Rev. Ciênc. Agron.* 47(1):143-151.
- Challem, J. 1995. *The Wonder of garlic*
- Chavan S.P., V.H. Lokhande, K.M. Nitnaware & T.D. Nikam. 2010. Influence of growth regulators and elicitors on cell growth and α -tocopherol and pigment productions in cell cultures of *Carthamus tinctorius* L. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89(6): 1701–1707.
- Chekki, Z.R., A. Snoussi, I. Hamrouni & N. Bouzouita. 2014. Chemical composition, anti bacterial and antioxidant activities of tunisian garlic (*Allium sativum*) essential oil and ethanol extract. *Mediterr. J. Chem.* 3(4):947-956.
- Chen, S.A., B. Zhao, X. Wang, X. Yuan, X., W. Yu. 2004. Promotion of the growth of *Crocus sativus* cells and the production of crocin by rare earth elements. *Biotechnol. Lett.* 26(1):27-30.
- Cherdshewasart, W., S. Subtang & W. Dahlan. 2007 Major isoflavonoid contents of the phytoestrogen rich-herb *Pueraria mirifica* in comparison with *Pueraria lobata*. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43(2):428-434.
- Crozier, A., M.N. Clifford & H. Ashihara, *Plant Secondary Metabolites*. Oxford: Blackwell Publishing Ltd.
- Davies, K. L., M.S. Davies & D. Francis. 1991. Zinc-induced vacuolation in root meristematic cells of *Festuca rubra* L. *Plant Cell Environ.* 14(4):399-406.
- Diaz-Vivancos, P., A. De-Simone, G. Kiddle & C.H. Foyer. 2015. Glutathione-linking cell proliferation to oxidative stress. *Free Rad. Biol. Med.* 89:1154–1164.
- Diaz-Vivancos, P., Y. Dong, K. Ziegler, J. Markovic, F.V. Pallardo, T.K. Pellny, P.J. Verrier, & C.H. Foyer. 2010. Recruitment of glutathione into the nucleus during cell proliferation adjusts whole-cell redox homeostasis in *Arabidopsis thaliana* and lowers the oxidative defence shield. *Plant J.* 64(5):825–838.
- Dixon, D. P., M. Skipsey & R. Edwards. 2010. Roles for glutathione transferases in plant secondary metabolism, *Phytochemistry*. 71:338-350
- Espinosa-Leal, C.A., C.A. Puente-Garza & S. Garcia-Lara. 2018. In vitro plant tissue culture : Mean for production of biological active compounds. *Planta.*, 248(1): 1-18.

- Farhadi, N., J.A. Panahandeh, M. Alireza & S.A. Salte. 2017. Effects of explant type, growth regulators and light intensity on callus induction and plant regeneration in four ecotypes of persian shallot (*Allium hirtifolium*), *Sci. Hortic.* 218:80-86
- Fatima, N., N. Ahmad & M. Anis, M. 2011. Enhanced in vitro regeneration and change in photosynthetic pigments, biomass and proline content in *Withania somnifera* L. (Dunal) induced by copper and zinc ions. *Plant Physiol. Biochem.* 49(12):1465-1471.
- Fauziah, A., W. Widoretno. 2015. Regenerasi tanaman dari eksplan kalus bawang putih (*Allium sativum* L.) secara in vitro, *J. Biotropika*, 3(1):32-35
- Figueiro, A.A., C.M. Correa, L.V. Astarita & E.R. Santare'm .2010. Long-term maintenance of in vitro cultures affects growth and secondary metabolism of St. John's wort. *Ciencia Rural.* 40:2115-2121.
- Fujita, Y. 1998. *Applications of Plant Cell and Tissue Culture : Industrial Production of Shikonin and Berberin*. Makalah disajikan dalam Ciba Foundation Symposium, Wiley, Chichester
- Gaosheng, H. & J. Jingming. 2012. Production of the useful secondary metabolites through the regulation of biosynthetic pathway in the cell & tissue suspension culture of medicinal plants. In: Gaosheng H and Jingming J (Eds.), *Recent Advances in Plant in Vitro Culture*, doi.org/10.5772/53038. pp. 197-210.
- Giri, C.C. & M. Zaheer. 2016. Chemical elicitors versus secondary metabolite production in vitro using plant cell, tissue and organ cultures: recent trends and a sky eye view appraisal. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 126(1): 1-18.
- Goncagul, G. & E. Ayaz. 2010. Antimicrobial effect of garlic (*Allium sativum*) and traditional medicine. *Recent Pat. Anti-Infect Drug Discov.* 5(1): 91-93.
- Gonzalez-Lamothe, R., G. Mitchell, M. Gattuso, M. S. Diarra, F. Malouin & K. Bouarab. 2009. Plant antimicrobial agents and their effects on plant and human pathogens. *Int. J. Mol. Sci.* 10(8):3400-3419.
- Gruhlke, M.C.H., D. Portz, M. Stitz, A. Anwar, T. Schneider, C. Jacob, N.L. Schlaich & A.J. Slusarenko. 2010. Allicin disrupts the cell's electrochemical potential and induces apoptosis in yeast. *Free Rad. Biol. Med.* 49(12):1916-1924.
- Grzam, A., M.N. Martin, R. Hell & A.J. Meyer. 2007. γ -Glutamyl transpeptidase GGT4 initiates vacuolar degradation of glutathione S-conjugates in Arabidopsis. *FEBS Lett.* 581:3131-3138
- Guerriero, G., R. J.A. Berni, F. Muñoz-Sanchez, E.M. Apone, A.A. Abdel-Salam, A.A. Qahtan, A.A. Alatar, C. Cantini, G. Cai, J.F. Hausman, K.S. Siddiqui, S.M.T. Hernández-Sotomayor & M. Faisal. 2018. Production of plant secondary metabolites: Examples, tips and suggestions for biotechnologists. *Genes*, doi:10.3390/genes9060309
- Gupta, K., S. Garg, J. Singh & M. Kumar. 2013. Enhanced production of naphthoquinone metabolite (shikonin) from cell suspension culture of *Arnebia sp.* and its up-scaling through bioreactor. *Biotech.* DOI 10.1007/s13205-013-0149-x
- Gupta, K., S. Garg, S., J. Singh & M. Kumar. 2013. Enhancement of the productivity of tea (*Camellia sinensis*) secondary metabolites in cell suspension cultures using pathway inducers. *J. Crop Sci. Biotechnol.* 16(2):143-149.
- Gusni, R.W., Suwirmen & A.Z. Noli. 2015. Peningkatan kandungan alkaloid kalus mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* [Scheff.]Boerl.) dengan pemberian prekursor triptofan pada medium Murashige & Skoog. *Jurnal Biologi Universitas Andalas*, 4(1):4-8.

- Habtemariam, S. 2019. The chemical and pharmacological basis of garlic (*Allium sativum* L.) as potential therapy for type 2 diabetes and metabolic syndrome. *Medicinal Foods as Potential Therapies for Type-2 Diabetes and Associated Diseases*, pp.689–749.
- Hailekidan, B., M. Andargie & K. Assefa. 2013. Regeneration from the bulbs of shallot (*Allium cepa* var. group aggregatum), *Res Plant Sci.* 1(2):45-52.
- Hansch, R. & R.R. Mendel. 2009. Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Curr. Opin. Plant Biol.* 12:259-266.
- Harris, J.C., S.L. Cottrell, S. Plummer & D. Lloyd. 2001. Antimicrobial properties of *Allium sativum* (garlic). *Appl Microbiol Biotechnol.* 57:282–286.
- Hernawan, U. E. & A.D. Setyawan. 2003. Senyawa organosulfur bawang putih (*Allium sativum* L) dan Aktivitas Biologinya. *Biofarmasi*, 1(2):65-76.
- Higuchi, O., K. Tateshita & H. Nishimura. 2003. Antioxidative activity of sulfur-containing compounds in allium species for human low-density lipoprotein (LDL) oxidation in vitro. *J. Agric. Food Chem.* 51, 24, 7208–7214.
- Hofgen, R., O. Kreft, L. Willmitzer & H. Hesse. 2001. Manipulation of thiol content in plant. *Amino Acid*, 20(3):291-299.
- Holkova, I., L. Bezáková, A. Balažová, M. Vanko & V. Blanáriková. 2010. Involvement of lipoxygenase in elicitor-stimulated sanguinarine accumulation in *Papaver somniferum* suspension cultures. *Plant Physiol. Biochem.* 48(10-11):887-892.
- Hoseinpoor, E.M. & F. Mortazaeinezhad. 2016. Recognition of sulfur compounds in tissue culture different organs of persian shallot (*Allium hirtifolium* Boiss) by GC/MS. *J. Herb. Drugs.* 6(4): 219-225.
- Hussain A, I.A. Qarshi, H. Nasir & I. Ullah. 2012. Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities. *Recent Adv. Plant in vitro Cult.*
- Inyai, C., G. Yusakul, J. Komaikul, T. Kitisripanya, K. Likhitwitayawuid, B.Sritularak & W. Putalun. 2020. Improvement of stilbene production by mulberry *Morus alba* root culture via precursor feeding and co-elicitation. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 44(4):653-660.
- Isah, T., S. Umar, A. Mujib, M.P. Sharma, P.E. Rajasekharan, N. Zafar & A. Frukh. 2017. Secondary metabolism of pharmaceuticals in the plant in vitro cultures: strategies, approaches, and limitations to achieving higher yield. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* doi:10.1007/s11240-017-1332-2.
- Jackson, P. & M.I. Attalla. 2010. N-Nitrosopiperazines form at high pH in post-combustion capture solutions containing piperazine : A low-energy collisional behavior study. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 24(24):3567–3577.
- James, J.T., R. Meyer & I.A. Dubery. 2008. Characterisation of two phenotypes of *Centella asiatica* in Southern Africa through the composition of four triterpenoids in callus, cell suspensions and leaves. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 94(1): 91-99.
- Jang H.J., H.J. Lee, D.K. Yoon, D.S. Ji, J.H. Kim JH & C.H. Lee. 2018. Antioxidant and antimicrobial activities of fresh garlic and aged garlic by-products extracted with different solvents. *Food Sci Biotechnol.* doi:10.1007/s10068-017-0246-4.
- Jeandet, P., C. Clement & E. Couro. 2016. Resveratrol production at large scale using plant cell suspensions. *Eng. Life Sci.* 14:622–632.
- Jesse, J., Mohseni & N. Shah. 1997. *Medical Attributes of Allium sativum – Garlic* (<http://wilkes1.wilkes.edu/~kklemow/Allium.html>), diakses 13 Desember 2017.
- Jiang, X. Y., X.S. Zhu, H.Y. Xu, Z.X. Zhao, S.Y. Li, S.Z. Li, J.H. Cai & J.M. Cao. 2017. Diallyl trisulfide suppresses tumor growth through the attenuation of Nrf2/Akt and

- activation of p38/JNK and potentiates cisplatin efficacy in gastric cancer treatment. *Acta Pharmacol. Sin.* 38:1048–1058.
- Jones, M.G., H.A. Collin, A. Tregova, L. Trueman, L. Brown, R. Cosstick, J. Hughes, J. Milne, M.C. Wilkinson, A.B. Tomset & B. Thomas. 2007. The biochemical and physiological genesis of alliin in garlic. *Med. Aromat. Plant Sci. Biotechnol.* 1(1):21-24
- Jones, M.G., J. Hughes, A. Tregova, J. Milne, A.B. Tomset & H.A. Collin. 2004. Biosynthesis of flavour precursor of onion and garlic. *J. Exp. Bot.* 55(404):1903-1918.
- Kadhim Al- Dulimyi, E.M., F.M. Abid & M.J. Abid Al-Gani. 2013. Determination of active ingredients (alliin & allicin) in different species of garlic extracts by using high performance liquid chromatography. *Diyala J Pure Sci.* 9(2):70-81.
- Kang, S.M., J.Y. Min, Y.D. Kim, D.J. Park, H.N. Jung, C.S. Karigar, Y.L. Ha, S.W. Kim & M.S. Choi. 2006. Effect of supplementing terpenoid biosynthetic precursors on the accumulation of bilobalide and ginkgolides in *Ginkgo biloba* cell cultures. *J. Biotechnol.* 123(1):85-92.
- Karuppusamy, S. 2010. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by in vitro tissue, organ and cell cultures. *J. Med. Plants Res.* 3(13): 1222-1239.
- Katare, D.P., A.C. Kharakwal & P. Sharma, P. 2014. Xanthotoxin conten in *Ammi majus* and agrobacterium mediated transformation. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 3(10):542-556.
- Kerk, N.M & L.J. Feldman. 1995. A biochemical model for the initiation and maintenance of the quiescent centre: implications for organization of root meristem. *Dev.* 121:2825–2833.
- Khatua, T.N., R.M. Borkar, S.A. Mohammed, A.K. Dinda, R. Srinivas, Banerjee & K. Sanjay. 2017. Novel sulfur metabolites of garlic attenuate cardiac hypertrophy and remodeling through induction of Na⁺/K⁺-ATPase expression. *Fron. Pharmacol.* 8:18.
- Kodera, Y., M. Ushijima, H. Amano, J.I. Suzuki & T. Matsutomo. 2017. Chemical and biological properties of S-1-propenyl-L-cysteine in aged garlic extract. *Molecules.* 22(4): 570.
- Kumar, S., A. Narula, M.P. Sharma, P.S. Srivastava. 2004. In vitro propagation of *Pluchea lanceolata*, a medicinal plant, and effect of heavy metals and different aminopurines on quercetin content. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.* 40(2): 171-176.
- Laboney, U.Z., G.C. Biswas, M. Abdullah-al-Shoeb & A. Miah. 2013. Callus induction and regeneration of potato from shoot tip culture, *J. Agric. Sci.* 3(1):40-5.
- Lakhotia, P., K.P. Singh, S.K. Singh, M.C. Singh, K.V. Prasad & K. Swaroop. 2014. Influence of biotic and abiotic elicitors on production of betalain pigments in bougainvillea callus cultures. *Indian J. Hortic.* 71(3): 373-378.
- Lestari, S.R. & M. Rifa'i. 2017. Daily administration of single garlic oil extract in mice as sub-chronic toxicity assesment. The 5th International Conference on Biological Science.
- Leustek, T., M.N. Martin & J.A. Bick. 2000. Pathways and regulation of sulfur metabolism revealed through molecular and genetic studies. *Annu. Rev. Plant Physiol Plant Mol. Biol.* 51:141-165.
- Liu, J.Y., Z.G. Guo & Z.L. Zeng. 2007. Improved accumulation of phenylethanoid glycosides by precursor feeding to suspension culture of *Cistanche salsa*. *Biochem. Eng. J.* 33(1):88-93.
- Luo, J. & G.Y. He. 2004. Optimization of elicitors and precursors for paclitaxel production in cell suspension culture of *Taxus chinensis* in the presence of nutrient feeding. *Process Biochem.* 39(9):1073-1079.

- Mahmutovic, O., I. Tahirovic, A. Copra, M. Memic, S. Ibragic & L. Karic. 2014. Correlation of total secondary sulfur compounds, total phenols and antioxidant capacity in the ramsons and garlic. *Br. J. Pharm. Res.* 4(23): 2662-2669.
- Maleki, M., M. Ghorbanpour & K. Kariman. 2017. Physiological and anti-oxidative responses of medicinal plants exposed to heavy metals stress. *Plant Gene.* 11: 247–254.
- Malik, S., R.M. Cusido, M.H. Mirjallili, E. Moyano, J.P. Palazon & M. Bonfill. 2011. Production of the anticancer drug taxol in *Taxus baccata* suspension cultures: A Review. *Process Biochem.* 46(1):23-34.
- Mansingh, D., N. Dalpati, V. Sali & A. Rachel-Vasanthi. 2018. Alliin the precursor of allicin in garlic extract mitigates proliferation of gastric adenocarcinoma cells by modulating apoptosis. *Pharmacogn. Mag.* 14(55):84-91.
- Manzano, A. I., O.J. Larkin, C.E. Dijkstra, P. Anthony, M.R. Davey, L. Eaves, R.J. A. Hill, R. Herranz & F.J. Medina. 2013. Meristematic cell proliferation and ribosome biogenesis are decoupled in diamagnetically levitated Arabidopsis seedlings, *BMC Plant Biol.* 13:124.
- Martin M.N., P.H. Saladores, E. Lambert E, A.O. Hudson & T. Leustek. 2007. Localization of members of the gamma-glutamyl transpeptidase family identifies sites of glutathione and glutathione S-conjugate hydrolysis. *Plant Physiol.* 144:1715–1732.
- Matam, P., G. Parvatam & N.P. Shetty. 2017. Enhanced production of vanillin flavour metabolites by precursor feeding in cell suspension cultures of *Decalepis hamiltonii* Wight & Arn., in shake flask culture. *3 Biotech.* 7(6):375-384.
- Meister, A., S.S. Tate & O.W. Griffith. 1981. Gamma-glutamyl transpeptidase. *Methods Enzymol.* 77:237-53.
- Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7(9): 405–410.
- Modarres, M., S.E. Bahabadi & M.E.T. Yazdi. 2018. Enhanced production of phenolic acids in cell suspension culture of *Salvia leriifolia* Benth. using growth regulators and sucrose. *Cytotechnol.* 70(2): 741–750.
- Mohammadi, M., A.R. Madvarb & S. Pourseyedic. 2014. Elicitors induced sulforaphane production in *Lepidium draba*. *Asian J. Biomed. Pharm. Sci.* 4(35):64-70.
- Moharrami, F., B. Hosseini, A. Sharafi, M. Farjaminezhad. 2017. Enhanced production of hyoscyamine and scopolamine from genetically transformed root culture of *Hyoscyamus reticulatus* L. elicited by iron oxide nanoparticles. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 53(2): 104-111.
- Murthy, H. N. & E.J. Lee. 2014. Production of secondary metabolite from cell and organ Culture : Strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 118(1):1-16.
- Mustafa, N.R, W. De-Winter, F. Van Iren & R. Verpoorte. 2012. Initiation, growth and cryopreservation of plant cell suspension cultures. *Nat. Protoc.* 6(6): 715-742.
- Muthaiya, M.J., P. Nagella, M. Thiruvengadam & A.A. Mandal. 2013. Enhancement of the productivity of tea (*Camellia sinensis*) secondary metabolites in cell suspension cultures using pathway inducers. *J. Crop Sci. Biotechnol.* 16(2):143-149.
- Nahar, K., M. Hasanuzzaman, M.M. Alam & M. Fujita. 2015. Glutathione-induced drought stress tolerance in mung bean: coordinated roles of the antioxidant defence and methylglyoxal detoxification systems. *AoB Plants.* 7: plv069.
- Naik, P.M. & J.M. Al-Khayri. 2016. Impact of abiotic elicitor on in vitro production of plant secondary metabolites : A Review. *J. Adv. Res. Biotechnol.* 1(2):1-7.

- Naik, P.M. & J.M. Al-Khayri. 2017. Extraction and estimation of secondary metabolites from date palm cell suspension cultures. *Methods Mol. Biol.* 1637(0):319-332.
- Namdeo. 2007. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: A Review, *Pharmacogn.* 1(1):69-79.
- Narula, A., S. Kumar & P.S. Srivastava. 2005. Abiotic metal stress enhances diosgenin yield in *Dioscorea bulbifera* L. cultures. *Plant Cell Rep.* 24(4):250-254.
- Negahdary, M., S. Omid, A. Eghbali-Zarch A, S.A. Mousavi, G. Mohseni, Y. Moradpour & G. Rahimi. 2015. Plant synthesis of silver nanoparticles using *Matricaria chamomilla* plant and evaluation of its antibacterial and antifungal effects. *Biomed. Res.* 26(4): 794-799.
- Nianiou-Obeidat, I., P. Madesis, C. Kissoudis, G. Voulgari, E. Chronopoulou, A. Tsaftaris & N.E. Labrou. 2017. Plant glutathione transferase-mediated stress tolerance: functions and biotechnological applications. *Plant Cell Rep.* 36(6):791-805.
- Nouroz, F., M. Mehboob, S. Noreen, F. Zaidi & T. Mobin. 2015. A Review on anticancer activities of garlic (*Allium sativum* L.). *Mid.-East J. Sci. Res.* 23 (6):1145-1151.
- Ochoa-Villarreal, M., S. Howat, S.M. Hong, M.O. Jang, Y.W. Jin, E.K. Lee, G.J. Loake. 2016. Plant cell culture strategies for the production of natural products. *BMB Rep.* 49(3):149-58
- Ogawa, K. 2005. Glutathione-associated regulation of plant growth and stress responses. *Antioxid. Redox Signal.* 7:973-981.
- Ohaeri, O.C. 2001. Effect of garlic oil on the levels of various enzymes in the serum and tissue of streptozotocin diabetic rats. *Biosci. Rep.* 21(1):19-24.
- Omar, S. H. & N.A. Al-Wabel. 2010. Organosulphur compound and possible mechanism of garlic in cancer. *Saudi Pharm. J.* 18(1):51-25.
- Osakabe, Y., N. Arinaga, T. Umezawa, S. Katsura, K. Nagamachi, H. Tanaka, H. Ohiraki, K. Yamada, S.U. Seo, M. Abo, E. Yoshimura, K. Shinozaki & K. Yamaguchi-Shinozaki. 2013. Osmotic stress responses and plant growth controlled by potassium transporters in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 25(2): 609-624.
- Ouyang, J., X. Wang, B. Zhao & Y. Wang. 2005. Enhanced production of phenylethanoid glycosides by precursor feeding to cell culture of *Cistanche deserticola*. *Process Biochem.* 40(11):3480-3484.
- Padiya, R., D. Chowdhury, R. Borkar, R. Srinivas, M. Pal Bhadra & S.K. Banerjee. 2014. Garlic attenuates cardiac oxidative stress via activation of PI3K/AKT/Nrf2-Keap1 pathway in fructose-fed diabetic rat. *Plos One*, 9(5)
- Palacio, L., J.J. Cantero, R.M. Cusido & M.E. Goleniowsky. 2012. Phenolic compound production in relation to differentiation in cell and tissue cultures of *Larrea divaricata* (Cav.). *Plant Sci.* 193-194(0):1-7.
- Palani, S., N.M. Joseph, M.J. Nisha, Y. Tegene & A. Zacharia. 2014. Medicinal properties of garlic - A concise review. *Curr. Res. Pharm. Sci.* 4(4):92-98
- Pan, Y., L. Li, S. Xiao, Z. Chen, S. Sarsaiya, S. Zhang, Y. ShangGuan, H. Liu & D. Xu. 2020. Callus growth kinetics and accumulation of secondary metabolites of *Bletilla striata* Rchb. F. Using a callus suspension culture. *Plos One*, 15(2).
- Parvu, M., A.E. Parvu, L. Vlase, O. Rosca-Casian & O. Parvu. 2011. Antifungal properties of *allium ursinum* L. ethanol extract. *J.Med. Plants Res.* 5(10):2041-2046.
- Pawar, K. & S.R. Thengane. 2011. Influence of abiotic elicitation on production of dipyrancoumarins in suspension cultures of *Calophyllum inophyllum* L. *Acta Physiol. Plant.* 33(6):2149-2158.

- Perassolo, M., C. Quevedo & V. Busto. 2007. Enhance of anthraquinone production by effect of proline and aminoindan-2-phosphonic acid in *Rubia tinctorum* suspension cultures. *Enzyme Microb. Technol.* 14(1-2):181-185.
- Pizorno, J. & M. Murray. 2000. *A Textbook of Natural Medicine: Allium sativum*, Edisi 2. Washington: Bastyr University.
- Pourianezhad, F., H. Rahnama, A. Mousavi, M. Khosrowshahli & S. Mafakheri. 2019. Parthenolide production in cell suspension culture of feverfew. *Bioresour. Bioprocess.* 6:23.
- Pourzand, A., A. Tajaddini, S. Pirouzpanah, M. Asghari-Jafarabadi, A.R. Ostadrahimi & Z. Sanaat. 2016. Associations between dietary allium vegetables and risk of breast cancer: A hospital-based matched case-control study. *J. Breast Cancer.* 19(3): 292-300.
- Praveen, N., H.N. Murthy & I.M. Chung. 2011. Improvement of growth and gymnemic acid production by altering the macro elements concentration and nitrogen source supply in cell suspension cultures of *Gymnema sylvestre* R. Br. *Ind. Crop Prod.* 33(2):282-286.
- Puad, N.I.M., M.A. Sarji, N.A.M. Fathil & M.Y. Abduh. 2018, Growth kinetics of *Citrus suhuiensis* cell suspension, *Biol. Nat. Resour. Eng. J.* 1(1)
- Qu, J., W. Zhang & X. Yu. 2011. A Combination of elicitation and precursor feeding leads to increased anthocyanin synthesis in cell suspension cultures of *Vitis vinifera*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 107(2):261-269.
- Radman, R., T. Saez, C. Bucke & T. Keshavarz. 2003. Elicitation of plants and microbial cell systems. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 37(1):91-102.
- Rahman, M.M., V. Fazlic. N.W. Saad. 2012. Antioxidant properties of raw garlic (*Allium sativum*) extract. *Int Food Res J.* 19(2):589-591.
- Rai, V. & S. Mehrotra. 2008. Chromium-induced changes in ultramorphology and secondary metabolites of *Phyllanthu samarus* Schum & Thonn.- an hepatoprotective plant. *Environ. Monit. Assess.* 147(1-3):307-315.
- Ramakrishna, A. & A.G. Ravishankar. 2011. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants, *Journal of Plant Signal. Behavior* 6(11):720-1731.
- Ramirez, D.A., D.A. Locatelli, C.A. Torres-Palazzolo, J.C. Altamirano & A.B. Camargo. 2017. Development of garlic bioactive compounds analytical methodology based on liquid phase microextraction using response surface design. Implications for dual analysis: Cooked and biological fluids samples. *Food Chem.* 215: 493-500.
- Ramirez-Estrada, K., H. Vidal-Limon, D. Hidalgo, E. Moyano, M. Golenioswki, R.M. Cusido & J. Palazon. 2016. Elicitation, an effective strategy for the biotechnological production of bioactive high-added value compounds in plant cell factories. *Molecules.* 21(2): 182.
- Ramulifho, E., T. Goche, A.J. Van, T.J. Tsilo, S. Chivasa & R. Ngara. 2019. Establishment and characterization of callus and cell suspension cultures of selected *Sorghum bicolor* (L.) Moench Varieties: A Resource for gene discovery in plant stress biology. *Agron.* 9:218
- Rao, S.R. & G.A. Ravishankar. 2002. Plant Cell Cultures : Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnol. Adv.* 20:101-153.
- Rao, S., K. Usha & Arjun. 2015. Production of secondary metabolites from callus cultures of *Centella asiatica* (L.) Urban, *Annal Phytomed.* 4(1):74-78.
- Reeve, V.E., M. Bosnic, E. Rozinova & C. Boehm-Wilcox. 1993. A garlic extract protects from ultraviolet B (280-320 nm) radiation-induced suppression of contact hypersensitivity. *Photochem. Photobiol.* 58(6): 813- 817

- nickel stress in the root cells of pigeonpea. *Environ. Exp. Bot.* 41(1):3-13.
- Srivastava, K.C. & O.D. Tyagi. 1993. Effects of a garlic-derived principle (ajoen) on aggregation and arachidonic acid metabolism in human blood platelets. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acid.*, 49(2):587-595
- Stasolla, C., M.F. Belmonte, L. Van Zyl, D.L. Craig, W. Liu, E.C. Yeung & R.R. Sederoff. 2004. The effect of reduced glutathione on morphology and gene expression of white spruce (*Picea glauca*) somatic embryos. *J. Exp. Bot.* 55(397):695-709.
- Syamsiah, I.S. & Tajudin. 2003. *Khasiat dan Manfaat Bawang Putih: Raja Antibiotik Alami*. Jakarta : Agromedia Pustaka.
- Synkova, H., S. Semoradova, R. Schnablova, E. Witters, M. Husak M & R. Valcke. 2006. Cytokinin-induced activity of antioxidant enzymes in transgenic Pssu-ipt tobacco during plant ontogeny. *Biol Plant* 50: 31-41.
- Taha, H.S., A. El-Kawy & M.A. Fathalla. 2012. New approach for achievement of inulin accumulation in suspension cultures of jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) using biotic elicitors. *J. Gen. Eng. Biotechnol.* 10(1):33-38.
- Tan, S.H., M. Mahmood & A. Ariff. 2013. Synergism affect between inoculum size and aggregate size on flavonoid production in *Centella asiatica* (L) urban (pegaga) cell suspension culture. *Int. J. Res. Eng. Technol.* 2(8):244-253.
- Tempo. 5 Nopember 2015. *BI Tegal Kembangkan Bawang Putih Jenis Unggul*. Dari : <http://bisnis.tempo.co/read/716321/bi-tegal-kembangkan-bawang-putih-benih-unggul>, diakses tanggal 4 Pebruari 2018.
- Ugwu, C.E. & M. Suru. 2016. The fungtional role of garlic and bioactive componens in cardiovascular and cerebrovascular health : What we do know. *J. Biosci. Med.* 4(10):28-42.
- Untari, I. 2010. Bawang putih sebagai obat paling mujarab bagi kesehatan. *Gaster*, 7(1):547-555.
- Utami & Mardiana. 2014. *Umbi Ajaib Tumpas Penyakit*, Jakarta: Penebar Swadaya.
- Van Assche, F. & H. Clijsters. 2006. Inhibition of photosynthesis in *Phaseolus vulgaris* by treatment with toxic concentrations of zinc: Effects on electron transport and photophosphorylation. *Physiol. Planta.* 66(4):717-721.
- Vargas, V.M.L. & N.O. Alejo. 2012. *Plant Cell Culture Protocols*, 3rd ed, New Jersey: Springer Science-Business Media, Totowa
- Vasconsuelo, A. & R. Boland. 2007. Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. *Plant Sci.* 172:861-875.
- Vasilev, N., C. Schmitz, U. Gromping, R. Fischer & S. Schillberg. 2014. Assessment of cultivation factors that affect biomass and geraniol production in transgenic tobacco cell suspension cultures. *PLoS ONE*. 9(8):e104620
- Verma, N. & S. Shukla. 2015. Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. *J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants.* 2(4):105-113.
- Verma, K.A., R.R. Singh & S. Singh. 2013. Mutation breeding in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don: An Overview. *J. Pharm. Phytochem.* 2(1):334-337.
- Villarreal, M.O., S. Howat, S. Hong, M.O. Jang, Y.W. Jin, E.K. Lee & G.J. Loake. 2016. Plant cell culture strategies for the production of natural products. *BMB Reports*, 49(3): 149-158.
- Wang, C., J. Wu, J. & X. Mei, X. 2001. Enhancement of taxol production and excretion in *Taxus chinensis* cell culture by fungal elicitation and medium renewal. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55(4):404-410.

- Wang, Z., G.F. Wilson & L. C. Griffith. 2002. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylates and regulates the drosophila eag potassium channel. *J. Biol. Chem.* 277(27):24022-24029.
- Wang, J.W. & J.Y. Wu. 2013. Effective elicitors and process strategies for enhancement of secondary metabolite production in hairy root cultures. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 134:55-89.
- Wang, J., J. Li, X. Wu, X. & W. Gao. 2015. HPLC-ESI-MS analysis, fed-batch cultivation enhances bioactive compound biosynthesis and immune-regulative effect of adventitious roots in *Pseudostellaria heterophylla*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 177(1): 63-75.
- Wang, J., J.L. Li, J. Li, J.X. Li, S. Liu, L. Huang & W.Y. 2017. Production of active compounds in medicinal plants: From plant tissue culture to biosynthesis. *Chinese Herb. Med.* 9(2): 115-125.
- Wang, J., J. Qian, L. Yao & Y. Lu. 2015. Enhanced production of flavonoids by methyl jasmonate elicitation in cell suspension culture of *Hypericum perforatum*. *Bioresour. Bioprocess.* 2(1):5-9.
- White, P.J. & M. Broadley. 2003. Calcium in plants. *Ann. Botany.* 92:487-511.
- Wu, J., C. Wang, X. Mei. 2001. Stimulation of taxol production and excretion in *Taxus spp* cell cultures by rare earth chemical lanthanum. *J. Biotechnol.* 85(1):67-73.
- Yeh, Y.Y. & L. Liu. 2001. Cholesterol-Lowering Effect of Garlic extracts and organosulfur compounds: human and animal studies. *J. Nutr.* 131(3s):989S-93S.
- Yoshimoto, N. & K. Saito. 2019. S-Alk(en)ylcysteine sulfoxides in the genus *Allium*: Proposed biosynthesis, chemical conversion, and bioactivities. *J. Exp. Bot.* doi:10.1093/jxb/erz243.
- Zang, Q., L. Zhou, F. Zhuge, H. Yang, X. Wang & X. Lin. 2016. Callus induction and regeneration via shoot tips of *Dendrocalamus hamiltonii*, *SpringerPlus*, 5:1799
- Zare, N., R. Farzaminezhad, R.A. Zakaria & M. Farjaminezhad. 2014. Enhanced thebaine production in *Papaver bracteatum* cell suspension culture by combination of elicitation and precursor feeding. *Nat. Prod. Res.* 28(10):711-717.
- Zhao, J.L., G.L. Zhou & Y.J. Wu. 2010. Effects of biotic and abiotic elicitors on cell growth and tanshinone accumulation in *Salvia miltiorrhiza* cell cultures. *J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87(1):137-144.
- Zheng, Z. & M. Wu. 2004. Cadmium treatment enhances the production of alkaloid secondary metabolites in *Catharanthus roseus*. *Plant Sci.* 166(2):507-514

LAMPIRAN

Lampiran 1. Komposisi media MS

Komponen	Komposisi (mg/L)
Unsur Makro	
NH_4NO_3	1650
KNO_3	1900
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
KH_2PO_4	170
Unsur Mikro	
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8
Na_2EDTA	37,3
H_3BO_3	6,2
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,3
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,6
KI	0,83
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025
Vitamin	
<i>Nicotinic acid</i>	0,5
<i>Pyridoxin HCl</i>	0,5
<i>Thiamin HCl</i>	0,1
<i>Glycine</i>	2
<i>Myo-inositol</i>	100

Lampiran 2. Independent Samples Test untuk Jenis Elisitor

Fresh Weight

Independent Samples Test									
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means					
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference
									Lower Upper
Fresh Weight (gr)	Equal variances assumed	3.234	.077	1.547	58	.127	.1322400	.0854875	-.0388817 .3033617
	Equal variances not assumed			1.547	53.381	.128	.1322400	.0854875	-.0391975 .3036775

■ Dry Weight

Independent Samples Test									
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means					
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference
									Lower Upper
Dry Weight (gr)	Equal variances assumed	3.327	.073	1.517	58	.135	.1295733	.0854287	-.0414307 .3005774
	Equal variances not assumed			1.517	53.379	.135	.1295733	.0854287	-.0417464 .3008931

■ Indeks Pertumbuhan Sel

Independent Samples Test									
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means					
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference
									Lower Upper
Indeks Pertumbuhan	Equal variances assumed	3.234	.077	1.547	58	.127	.1322400	.0854875	-.0388817 .3033617
	Equal variances not assumed			1.547	53.381	.128	.1322400	.0854875	-.0391975 .3036775

■ SCV

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference		Lower	Upper
Settled Cell Volume (%)	Equal variances assumed	3.676	.060	1.469	58	.147	.7000000	.4764572		-.2537328	1.6537328
	Equal variances not assumed			1.469	52.967	.148	.7000000	.4764572		-.2556659	1.6556659



Lampiran 3. Analisis Ragam untuk Konsentrasi Elisitor Fe^{3+}

• Fresh Weight

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Fresh Weight (gr)

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	4.081 ^a	5	.816	600.351	.000
Intercept	122.469	1	122.469	90070.881	.000
Konsentrasi	4.081	5	.816	600.351	.000
Error	.033	24	.001		
Total	128.070	30			
Corrected Total	4.114	29			

a. R Squared = .992 (Adjusted R Squared = .990)

■ Dry Weight

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Dry Weight (gr)

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	4.077 ^a	5	.815	617.460	.000
Intercept	34.387	1	34.387	26039.669	.000
Konsentrasi	4.077	5	.815	617.460	.000
Error	.032	24	.001		
Total	38.859	30			
Corrected Total	4.109	29			

a. R Squared = .992 (Adjusted R Squared = .991)

■ Indeks Pertumbuhan

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Indeks Pertumbuhan

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	4.081 ^a	5	.816	600.351	.000
Intercept	31.663	1	31.663	23286.863	.000
Konsentrasi	4.081	5	.816	600.351	.000
Error	.033	24	.001		
Total	36.108	30			
Corrected Total	4.114	29			

a. R Squared = .992 (Adjusted R Squared = .990)

■ SCV

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Settled Cell Volume (%)

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	128.230 ^a	5	25.646	641.643	.000
Intercept	3783.180	1	3783.180	94652.527	.000
Konsentrasi	128.230	5	25.646	641.643	.000
Error	.959	24	.040		
Total	3959.889	30			
Corrected Total	129.189	29			

a. R Squared = .993 (Adjusted R Squared = .991)

3.1 Uji lanjut LSD elisitor Fe³⁺

■ Fresh Weight

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Fresh Weight (gr)

LSD

(I) Konsentrasi Fe (mmol/L)	(J) Konsentrasi Fe (mmol/L)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval Lower Bound	Upper Bound
0 mmol/L	0.1 mmol/L	-.241033 [*]	.0223284	.000	-.287117	-.194950
	0.2 mmol/L	-.293750 [*]	.0247359	.000	-.344802	-.242698
	0.3 mmol/L	-.527240 [*]	.0233212	.000	-.575373	-.479107
	0.4 mmol/L	-.767880 [*]	.0233212	.000	-.816013	-.719747
	0.5 mmol/L	-1.116420 [*]	.0233212	.000	-1.164553	-1.068287
0.1 mmol/L	0 mmol/L	.241033 [*]	.0223284	.000	.194950	.287117
	0.2 mmol/L	-.052717 [*]	.0238021	.037	-.101842	-.003592
	0.3 mmol/L	-.286207 [*]	.0223284	.000	-.332290	-.240123
	0.4 mmol/L	-.526847 [*]	.0223284	.000	-.572930	-.480763
	0.5 mmol/L	-.875387 [*]	.0223284	.000	-.921470	-.829303
0.2 mmol/L	0 mmol/L	.293750 [*]	.0247359	.000	.242698	.344802
	0.1 mmol/L	.052717 [*]	.0238021	.037	.003592	.101842
	0.3 mmol/L	-.233490 [*]	.0247359	.000	-.284542	-.182438
	0.4 mmol/L	-.474130 [*]	.0247359	.000	-.525182	-.423078
	0.5 mmol/L	-.822670 [*]	.0247359	.000	-.873722	-.771618
0.3 mmol/L	0 mmol/L	.527240 [*]	.0233212	.000	.479107	.575373
	0.1 mmol/L	.286207 [*]	.0223284	.000	.240123	.332290
	0.2 mmol/L	.233490 [*]	.0247359	.000	.182438	.284542
	0.4 mmol/L	-.240640 [*]	.0233212	.000	-.288773	-.192507
	0.5 mmol/L	-.589180 [*]	.0233212	.000	-.637313	-.541047
0.4 mmol/L	0 mmol/L	.767880 [*]	.0233212	.000	.719747	.816013
	0.1 mmol/L	.526847 [*]	.0223284	.000	.480763	.572930
	0.2 mmol/L	.474130 [*]	.0247359	.000	.423078	.525182
	0.3 mmol/L	.240640 [*]	.0233212	.000	.192507	.288773
	0.5 mmol/L	-.348540 [*]	.0233212	.000	-.396673	-.300407
0.5 mmol/L	0 mmol/L	1.116420 [*]	.0233212	.000	1.068287	1.164553
	0.1 mmol/L	.875387 [*]	.0223284	.000	.829303	.921470
	0.2 mmol/L	.822670 [*]	.0247359	.000	.771618	.873722
	0.3 mmol/L	.589180 [*]	.0233212	.000	.541047	.637313
	0.4 mmol/L	.348540 [*]	.0233212	.000	.300407	.396673

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .001.

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

■ Dry Weight

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Dry Weight (gr)
LSD

(I) Konsentrasi Fe (mmol/L)	(J) Konsentrasi Fe (mmol/L)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
0 mmol/L	0.1 mmol/L	-.239923 ^a	.0220048	.000	-.285339	-.194508
	0.2 mmol/L	-.293165 ^a	.0243774	.000	-.343478	-.242852
	0.3 mmol/L	-.529940 ^a	.0229833	.000	-.577375	-.482505
	0.4 mmol/L	-.769140 ^a	.0229833	.000	-.816575	-.721705
	0.5 mmol/L	-.1114300 ^a	.0229833	.000	-1.161735	-1.066865
0.1 mmol/L	0 mmol/L	.239923 ^a	.0220048	.000	.194508	.285339
	0.2 mmol/L	-.053242 ^a	.0234572	.032	-.101655	-.004828
	0.3 mmol/L	-.290017 ^a	.0220048	.000	-.335432	-.244601
	0.4 mmol/L	-.529217 ^a	.0220048	.000	-.574632	-.483801
	0.5 mmol/L	-.874377 ^a	.0220048	.000	-.919792	-.828961
0.2 mmol/L	0 mmol/L	.293165 ^a	.0243774	.000	.242852	.343478
	0.1 mmol/L	.053242 ^a	.0234572	.032	.004828	.101655
	0.3 mmol/L	-.236775 ^a	.0243774	.000	-.287088	-.186462
	0.4 mmol/L	-.475975 ^a	.0243774	.000	-.526288	-.425662
	0.5 mmol/L	-.821135 ^a	.0243774	.000	-.871448	-.770822
0.3 mmol/L	0 mmol/L	.529940 ^a	.0229833	.000	.482505	.577375
	0.1 mmol/L	.290017 ^a	.0220048	.000	.244601	.335432
	0.2 mmol/L	.236775 ^a	.0243774	.000	.186462	.287088
	0.4 mmol/L	-.239200 ^a	.0229833	.000	-.286635	-.191765
	0.5 mmol/L	-.584360 ^a	.0229833	.000	-.631795	-.536925
0.4 mmol/L	0 mmol/L	.769140 ^a	.0229833	.000	.721705	.816575
	0.1 mmol/L	.529217 ^a	.0220048	.000	.483801	.574632
	0.2 mmol/L	.475975 ^a	.0243774	.000	.425662	.526288
	0.3 mmol/L	.239200 ^a	.0229833	.000	.191765	.286635
	0.5 mmol/L	-.345160 ^a	.0229833	.000	-.392595	-.297725
0.5 mmol/L	0 mmol/L	1.114300 ^a	.0229833	.000	1.066865	1.161735
	0.1 mmol/L	.874377 ^a	.0220048	.000	.828961	.919792
	0.2 mmol/L	.821135 ^a	.0243774	.000	.770822	.871448
	0.3 mmol/L	.584360 ^a	.0229833	.000	.536925	.631795
	0.4 mmol/L	.345160 ^a	.0229833	.000	.297725	.392595

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .001.

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

■ Indeks Pertumbuhan Sel

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Indeks Pertumbuhan
LSD

(I) Konsentrasi Fe (mmol/L)	(J) Konsentrasi Fe (mmol/L)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
0 mmol/L	0.1 mmol/L	-.241033 ^a	.0223284	.000	-.287117	-.194950
	0.2 mmol/L	-.293750 ^a	.0247359	.000	-.344802	-.242698
	0.3 mmol/L	-.527240 ^a	.0233212	.000	-.575373	-.479107
	0.4 mmol/L	-.767980 ^a	.0233212	.000	-.816013	-.719747
	0.5 mmol/L	-.1116420 ^a	.0233212	.000	-1.164553	-1.068287
0.1 mmol/L	0 mmol/L	.241033 ^a	.0223284	.000	.194950	.287117
	0.2 mmol/L	-.052717 ^a	.0238021	.037	-.101842	-.003592
	0.3 mmol/L	-.286207 ^a	.0223284	.000	-.332290	-.240123
	0.4 mmol/L	-.526847 ^a	.0223284	.000	-.572930	-.480763
	0.5 mmol/L	-.875387 ^a	.0223284	.000	-.921470	-.829303
0.2 mmol/L	0 mmol/L	.293750 ^a	.0247359	.000	.242698	.344802
	0.1 mmol/L	.052717 ^a	.0238021	.037	.003592	.101842
	0.3 mmol/L	-.233490 ^a	.0247359	.000	-.284542	-.182438
	0.4 mmol/L	-.474130 ^a	.0247359	.000	-.526182	-.423078
	0.5 mmol/L	-.822670 ^a	.0247359	.000	-.873722	-.771618
0.3 mmol/L	0 mmol/L	.527240 ^a	.0233212	.000	.479107	.575373
	0.1 mmol/L	.286207 ^a	.0223284	.000	.240123	.332290
	0.2 mmol/L	.233490 ^a	.0247359	.000	.182438	.284542
	0.4 mmol/L	-.240640 ^a	.0233212	.000	-.288773	-.192507
	0.5 mmol/L	-.589180 ^a	.0233212	.000	-.637313	-.541047
0.4 mmol/L	0 mmol/L	.767980 ^a	.0233212	.000	.719747	.816013
	0.1 mmol/L	.526847 ^a	.0223284	.000	.480763	.572930
	0.2 mmol/L	.474130 ^a	.0247359	.000	.423078	.526182
	0.3 mmol/L	.240640 ^a	.0233212	.000	.192607	.288773
	0.5 mmol/L	-.348540 ^a	.0233212	.000	-.396673	-.300407
0.5 mmol/L	0 mmol/L	1.116420 ^a	.0233212	.000	1.068287	1.164553
	0.1 mmol/L	.875387 ^a	.0223284	.000	.829303	.921470
	0.2 mmol/L	.822670 ^a	.0247359	.000	.771618	.873722
	0.3 mmol/L	.589180 ^a	.0233212	.000	.541047	.637313
	0.4 mmol/L	.348540 ^a	.0233212	.000	.300407	.396673

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .001.

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

■ SCV

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Settled Cell Volume (%)
LSD

(I) Konsentrasi Fe (mmol/L)	(J) Konsentrasi Fe (mmol/L)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
0 mmol/L	0.1 mmol/L	-1.411111*	.1210593	.000	-1.660965	-1.161257
	0.2 mmol/L	-1.633333*	.1341123	.000	-1.910128	-1.356539
	0.3 mmol/L	-3.000000*	.1264423	.000	-3.260964	-2.739036
	0.4 mmol/L	-4.333333*	.1264423	.000	-4.594297	-4.072369
	0.5 mmol/L	-6.266667*	.1264423	.000	-6.527631	-6.005703
0.1 mmol/L	0 mmol/L	1.411111*	.1210593	.000	1.161257	1.660965
	0.2 mmol/L	-.222222	.1290496	.098	-.488568	.044123
	0.3 mmol/L	-1.588889*	.1210593	.000	-1.838743	-1.339035
	0.4 mmol/L	-2.922222*	.1210593	.000	-3.172076	-2.672368
	0.5 mmol/L	-4.855556*	.1210593	.000	-5.105410	-4.605701
0.2 mmol/L	0 mmol/L	1.633333*	.1341123	.000	1.356539	1.910128
	0.1 mmol/L	.222222	.1290496	.098	-.044123	.488568
	0.3 mmol/L	-1.366667*	.1341123	.000	-1.643461	-1.089872
	0.4 mmol/L	-2.700000*	.1341123	.000	-2.976794	-2.423206
	0.5 mmol/L	-4.633333*	.1341123	.000	-4.910128	-4.356539
0.3 mmol/L	0 mmol/L	3.000000*	.1264423	.000	2.739036	3.260964
	0.1 mmol/L	1.588889*	.1210593	.000	1.339035	1.838743
	0.2 mmol/L	1.366667*	.1341123	.000	1.089872	1.643461
	0.4 mmol/L	-1.333333*	.1264423	.000	-1.594297	-1.072369
	0.5 mmol/L	-3.266667*	.1264423	.000	-3.527631	-3.005703
0.4 mmol/L	0 mmol/L	4.333333*	.1264423	.000	4.072369	4.594297
	0.1 mmol/L	2.922222*	.1210593	.000	2.672368	3.172076
	0.2 mmol/L	2.700000*	.1341123	.000	2.423206	2.976794
	0.3 mmol/L	1.333333*	.1264423	.000	1.072369	1.594297
	0.5 mmol/L	-1.933333*	.1264423	.000	-2.194297	-1.672369
0.5 mmol/L	0 mmol/L	6.266667*	.1264423	.000	6.005703	6.527631
	0.1 mmol/L	4.855556*	.1210593	.000	4.605701	5.105410
	0.2 mmol/L	4.633333*	.1341123	.000	4.356539	4.910128
	0.3 mmol/L	3.266667*	.1264423	.000	3.005703	3.527631
	0.4 mmol/L	1.933333*	.1264423	.000	1.672369	2.194297

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .040.

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.



Lampiran 4. Analisis Ragam untuk Konsentrasi Elisitor Zn^{2+}

■ Fresh Weight

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Fresh Weight (gr)

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	2.209 ^a	5	.442	304.786	.000
Intercept	107.213	1	107.213	73958.065	.000
Konsentrasi	2.209	5	.442	304.786	.000
Error	.035	24	.001		
Total	110.596	30			
Corrected Total	2.244	29			

a. R Squared = .984 (Adjusted R Squared = .981)

■ Dry Weight

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Dry Weight (gr)

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	2.207 ^a	5	.441	315.096	.000
Intercept	26.689	1	26.689	19052.228	.000
Konsentrasi	2.207	5	.441	315.096	.000
Error	.034	24	.001		
Total	29.127	30			
Corrected Total	2.241	29			

a. R Squared = .985 (Adjusted R Squared = .982)

■ Indeks Pertumbuhan

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Indeks Pertumbuhan

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	2.209 ^a	5	.442	304.786	.000
Intercept	24.155	1	24.155	16662.726	.000
Konsentrasi	2.209	5	.442	304.786	.000
Error	.035	24	.001		
Total	26.569	30			
Corrected Total	2.244	29			

a. R Squared = .984 (Adjusted R Squared = .981)

■ SCV

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Settled Cell Volume (%)

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	67.246 ^a	5	13.449	303.135	.000
Intercept	3335.669	1	3335.669	75183.088	.000
Konsentrasi	67.246	5	13.449	303.135	.000
Error	1.065	24	.044		
Total	3439.111	30			
Corrected Total	68.311	29			

a. R Squared = .984 (Adjusted R Squared = .981)

4.1 Uji lanjut LSD elisitor Zn²⁺

■ Fresh Weight

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Fresh Weight (gr)
LSD

(I) Konsentrasi Zn (mmol/L)	(J) Konsentrasi Zn (mmol/L)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
0 mmol/L	0.1 mmol/L	-.124443 [*]	.0230550	.000	-.172027	-.076860
	0.2 mmol/L	-.216335 [*]	.0255409	.000	-.269049	-.163621
	0.3 mmol/L	-.393140 [*]	.0240802	.000	-.442839	-.343441
	0.4 mmol/L	-.521140 [*]	.0240802	.000	-.570839	-.471441
	0.5 mmol/L	-.811820 [*]	.0240802	.000	-.861519	-.762121
0.1 mmol/L	0 mmol/L	.124443 [*]	.0230550	.000	.076860	.172027
	0.2 mmol/L	-.091892 [*]	.0245767	.001	-.142616	-.041168
	0.3 mmol/L	-.268697 [*]	.0230550	.000	-.316280	-.221113
	0.4 mmol/L	-.396697 [*]	.0230550	.000	-.444280	-.349113
	0.5 mmol/L	-.687377 [*]	.0230550	.000	-.734960	-.639793
0.2 mmol/L	0 mmol/L	.216335 [*]	.0255409	.000	.163621	.269049
	0.1 mmol/L	.091892 [*]	.0245767	.001	.041168	.142616
	0.3 mmol/L	-.176805 [*]	.0255409	.000	-.229519	-.124091
	0.4 mmol/L	-.304805 [*]	.0255409	.000	-.357519	-.252091
	0.5 mmol/L	-.595485 [*]	.0255409	.000	-.648199	-.542771
0.3 mmol/L	0 mmol/L	.393140 [*]	.0240802	.000	.343441	.442839
	0.1 mmol/L	.268697 [*]	.0230550	.000	.221113	.316280
	0.2 mmol/L	.176805 [*]	.0255409	.000	.124091	.229519
	0.4 mmol/L	-.128000 [*]	.0240802	.000	-.177699	-.078301
	0.5 mmol/L	-.418680 [*]	.0240802	.000	-.468379	-.368981
0.4 mmol/L	0 mmol/L	.521140 [*]	.0240802	.000	.471441	.570839
	0.1 mmol/L	.396697 [*]	.0230550	.000	.349113	.444280
	0.2 mmol/L	.304805 [*]	.0255409	.000	.252091	.357519
	0.3 mmol/L	.128000 [*]	.0240802	.000	.078301	.177699
	0.5 mmol/L	-.290680 [*]	.0240802	.000	-.340379	-.240981
0.5 mmol/L	0 mmol/L	.811820 [*]	.0240802	.000	.762121	.861519
	0.1 mmol/L	.687377 [*]	.0230550	.000	.639793	.734960
	0.2 mmol/L	.595485 [*]	.0255409	.000	.542771	.648199
	0.3 mmol/L	.418680 [*]	.0240802	.000	.368981	.468379
	0.4 mmol/L	.290680 [*]	.0240802	.000	.240981	.340379

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .001.

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

■ Dry Weight

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Dry Weight (gr)
LSD

(i) Konsentrasi Zn (mmol/L)	(j) Konsentrasi Zn (mmol/L)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
0 mmol/L	0.1 mmol/L	-.124813 [*]	.0226636	.000	-.171589	-.078038
	0.2 mmol/L	-.216005 [*]	.0261072	.000	-.267824	-.164186
	0.3 mmol/L	-.393060 [*]	.0236713	.000	-.441915	-.344205
	0.4 mmol/L	-.521040 [*]	.0236713	.000	-.569895	-.472185
	0.5 mmol/L	-.811540 [*]	.0236713	.000	-.860395	-.762685
0.1 mmol/L	0 mmol/L	.124813 [*]	.0226636	.000	.078038	.171589
	0.2 mmol/L	-.091192 [*]	.0241594	.001	-.141054	-.041329
	0.3 mmol/L	-.268247 [*]	.0226636	.000	-.316022	-.221471
	0.4 mmol/L	-.396227 [*]	.0226636	.000	-.443002	-.349451
	0.5 mmol/L	-.686727 [*]	.0226636	.000	-.733502	-.639951
0.2 mmol/L	0 mmol/L	.216005 [*]	.0261072	.000	.164186	.267824
	0.1 mmol/L	.091192 [*]	.0241594	.001	.041329	.141054
	0.3 mmol/L	-.177055 [*]	.0251072	.000	-.228874	-.125236
	0.4 mmol/L	-.305035 [*]	.0251072	.000	-.356854	-.253216
	0.5 mmol/L	-.595535 [*]	.0251072	.000	-.647354	-.543716
0.3 mmol/L	0 mmol/L	.393060 [*]	.0236713	.000	.344205	.441915
	0.1 mmol/L	.268247 [*]	.0226636	.000	.221471	.316022
	0.2 mmol/L	.177055 [*]	.0251072	.000	.125236	.228874
	0.4 mmol/L	-.127980 [*]	.0236713	.000	-.176835	-.079125
	0.5 mmol/L	-.418480 [*]	.0236713	.000	-.467335	-.369625
0.4 mmol/L	0 mmol/L	.521040 [*]	.0236713	.000	.472185	.569895
	0.1 mmol/L	.396227 [*]	.0226636	.000	.349451	.443002
	0.2 mmol/L	.305035 [*]	.0251072	.000	.253216	.356854
	0.3 mmol/L	.127980 [*]	.0236713	.000	.079125	.176835
	0.5 mmol/L	-.290500 [*]	.0236713	.000	-.339355	-.241645
0.5 mmol/L	0 mmol/L	.811540 [*]	.0236713	.000	.762685	.860395
	0.1 mmol/L	.686727 [*]	.0226636	.000	.639951	.733502
	0.2 mmol/L	.595535 [*]	.0251072	.000	.543716	.647354
	0.3 mmol/L	.418480 [*]	.0236713	.000	.369625	.467335
	0.4 mmol/L	.290500 [*]	.0236713	.000	.241645	.339355

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .001.

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

■ Indeks Pertumbuhan Sel

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Indeks Pertumbuhan
LSD

(i) Konsentrasi Zn (mmol/L)	(j) Konsentrasi Zn (mmol/L)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
0 mmol/L	0.1 mmol/L	-.124443 [*]	.0230550	.000	-.172027	-.076860
	0.2 mmol/L	-.216335 [*]	.0255409	.000	-.269049	-.163621
	0.3 mmol/L	-.393140 [*]	.0240802	.000	-.442839	-.343441
	0.4 mmol/L	-.521140 [*]	.0240802	.000	-.570839	-.471441
	0.5 mmol/L	-.811820 [*]	.0240802	.000	-.861519	-.762121
0.1 mmol/L	0 mmol/L	.124443 [*]	.0230550	.000	.076860	.172027
	0.2 mmol/L	-.091892 [*]	.0245767	.001	-.142616	-.041168
	0.3 mmol/L	-.268697 [*]	.0230550	.000	-.316280	-.221113
	0.4 mmol/L	-.396697 [*]	.0230550	.000	-.444280	-.349113
	0.5 mmol/L	-.687377 [*]	.0230550	.000	-.734960	-.639793
0.2 mmol/L	0 mmol/L	.216335 [*]	.0255409	.000	.163621	.269049
	0.1 mmol/L	.091892 [*]	.0245767	.001	.041168	.142616
	0.3 mmol/L	-.176805 [*]	.0255409	.000	-.229519	-.124091
	0.4 mmol/L	-.304805 [*]	.0255409	.000	-.357519	-.252091
	0.5 mmol/L	-.595485 [*]	.0255409	.000	-.648199	-.542771
0.3 mmol/L	0 mmol/L	.393140 [*]	.0240802	.000	.343441	.442839
	0.1 mmol/L	.268697 [*]	.0230550	.000	.221113	.316280
	0.2 mmol/L	.176805 [*]	.0255409	.000	.124091	.229519
	0.4 mmol/L	-.128000 [*]	.0240802	.000	-.177699	-.078301
	0.5 mmol/L	-.418680 [*]	.0240802	.000	-.468379	-.368981
0.4 mmol/L	0 mmol/L	.521140 [*]	.0240802	.000	.471441	.570839
	0.1 mmol/L	.396697 [*]	.0230550	.000	.349113	.444280
	0.2 mmol/L	.304805 [*]	.0255409	.000	.252091	.357519
	0.3 mmol/L	.128000 [*]	.0240802	.000	.078301	.177699
	0.5 mmol/L	-.290580 [*]	.0240802	.000	-.340379	-.240981
0.5 mmol/L	0 mmol/L	.811820 [*]	.0240802	.000	.762121	.861519
	0.1 mmol/L	.687377 [*]	.0230550	.000	.639793	.734960
	0.2 mmol/L	.595485 [*]	.0255409	.000	.542771	.648199
	0.3 mmol/L	.418680 [*]	.0240802	.000	.368981	.468379
	0.4 mmol/L	.290580 [*]	.0240802	.000	.240981	.340379

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .001.

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

■ SCV

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Settled Cell Volume (%)
LSD

(I) Konsentrasi Zn (mmol/L)	(J) Konsentrasi Zn (mmol/L)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
0 mmol/L	0.1 mmol/L	-.655556 ^a	.1275461	.000	-.918798	-.392313
	0.2 mmol/L	-1.183333 ^a	.1412985	.000	-1.474959	-.891707
	0.3 mmol/L	-2.133333 ^a	.1332175	.000	-2.408281	-1.858386
	0.4 mmol/L	-2.866667 ^a	.1332175	.000	-3.141614	-2.591719
	0.5 mmol/L	-4.466667 ^a	.1332175	.000	-4.741614	-4.191719
0.1 mmol/L	0 mmol/L	.655556 ^a	.1275461	.000	.392313	.918798
	0.2 mmol/L	-.527778 ^a	.1359646	.001	-.808395	-.247161
	0.3 mmol/L	-1.477778 ^a	.1275461	.000	-1.741020	-1.214536
	0.4 mmol/L	-2.211111 ^a	.1275461	.000	-2.474353	-1.947869
	0.5 mmol/L	-3.811111 ^a	.1275461	.000	-4.074353	-3.547869
0.2 mmol/L	0 mmol/L	1.183333 ^a	.1412985	.000	.891707	1.474959
	0.1 mmol/L	.527778 ^a	.1359646	.001	.247161	.808395
	0.3 mmol/L	-.950000 ^a	.1412985	.000	-1.241626	-.658374
	0.4 mmol/L	-1.683333 ^a	.1412985	.000	-1.974959	-1.391707
	0.5 mmol/L	-3.283333 ^a	.1412985	.000	-3.574959	-2.991707
0.3 mmol/L	0 mmol/L	2.133333 ^a	.1332175	.000	1.858386	2.408281
	0.1 mmol/L	1.477778 ^a	.1275461	.000	1.214536	1.741020
	0.2 mmol/L	.950000 ^a	.1412985	.000	.658374	1.241626
	0.4 mmol/L	-.733333 ^a	.1332175	.000	-1.008281	-.458386
	0.5 mmol/L	-2.333333 ^a	.1332175	.000	-2.608281	-2.058386
0.4 mmol/L	0 mmol/L	2.866667 ^a	.1332175	.000	2.591719	3.141614
	0.1 mmol/L	2.211111 ^a	.1275461	.000	1.947869	2.474353
	0.2 mmol/L	1.683333 ^a	.1412985	.000	1.391707	1.974959
	0.3 mmol/L	.733333 ^a	.1332175	.000	.458386	1.008281
	0.5 mmol/L	-1.600000 ^a	.1332175	.000	-1.874947	-1.325053
0.5 mmol/L	0 mmol/L	4.466667 ^a	.1332175	.000	4.191719	4.741614
	0.1 mmol/L	3.811111 ^a	.1275461	.000	3.547869	4.074353
	0.2 mmol/L	3.283333 ^a	.1412985	.000	2.991707	3.574959
	0.3 mmol/L	2.333333 ^a	.1332175	.000	2.058386	2.608281
	0.4 mmol/L	1.600000 ^a	.1332175	.000	1.325053	1.874947

Based on observed means.

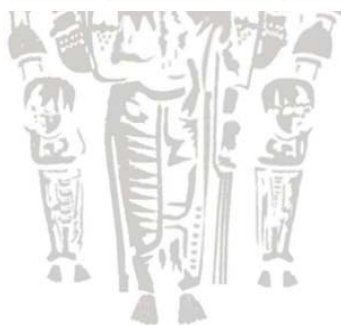
The error term is Mean Square(Error) = .044.

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.



Lampiran 5. Independent Samples Test untuk Jenis Prekursor

Independent Samples Test										
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Fresh_Weight	Equal variances assumed	.990	.324	-.218	58	.828	-.02410	.11042	-.24513	.19692
	Equal variances not assumed			-.218	53.514	.828	-.02410	.11042	-.24553	.19732
Dry_Weight	Equal variances assumed	1.026	.315	-.207	58	.836	-.02290	.11044	-.24398	.19818
	Equal variances not assumed			-.207	53.483	.837	-.02290	.11044	-.24437	.19858
Indeks_Pertumbuhan	Equal variances assumed	.990	.324	-.218	58	.828	-.02410	.11042	-.24513	.19692
	Equal variances not assumed			-.218	53.514	.828	-.02410	.11042	-.24553	.19732
Settled_Cell_Volume	Equal variances assumed	.998	.322	-.233	58	.817	-.14367	.61670	-1.37813	1.09080
	Equal variances not assumed			-.233	53.603	.817	-.14367	.61670	-1.38029	1.09296



Lampiran 6. Analisis Ragam untuk Konsentrasi Prekursor Glutation

■ Fresh Weight

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Fresh_Weight

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	3.752 ^a	5	.750	1139.326	.000
Intercept	124.595	1	124.595	189156.291	.000
Konsentrasi	3.752	5	.750	1139.326	.000
Error	.016	24	.001		
Total	128.363	30			
Corrected Total	3.768	29			

a. R Squared = .996 (Adjusted R Squared = .995)

■ Dry Weight

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Dry_Weight

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	3.749 ^a	5	.750	1165.324	.000
Intercept	35.233	1	35.233	54764.159	.000
Konsentrasi	3.749	5	.750	1165.324	.000
Error	.015	24	.001		
Total	38.998	30			
Corrected Total	3.764	29			

a. R Squared = .996 (Adjusted R Squared = .995)

■ Indeks Pertumbuhan

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Indeks_Pertumbuhan

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	3.752 ^a	5	.750	1139.326	.000
Intercept	32.319	1	32.319	49065.899	.000
Konsentrasi	3.752	5	.750	1139.326	.000
Error	.016	24	.001		
Total	36.087	30			
Corrected Total	3.768	29			

a. R Squared = .996 (Adjusted R Squared = .995)

SCV

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Settled_Cell_Volume

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	117.517 ^a	5	23.503	1046.925	.000
Intercept	3861.271	1	3861.271	171994.243	.000
Konsentrasi	117.517	5	23.503	1046.925	.000
Error	.539	24	.022		
Total	3979.327	30			
Corrected Total	118.056	29			

a. R Squared = .995 (Adjusted R Squared = .994)

6.1 Uji lanjut LSD prekursor glutation

■ Fresh Weight

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Fresh_Weight
LSD

(I) Konsentrasi	(J) Konsentrasi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
0 mmol/L	5 mmol/L	-.3540400 [*]	.01623193	.000	-.3875411	-.3205389
	7.5 mmol/L	-.5318000 [*]	.01623193	.000	-.5653011	-.4982989
	10 mmol/L	-.1302000 [*]	.01623193	.000	-1.1637011	-1.0966989
	12.5 mmol/L	-.6531400 [*]	.01623193	.000	-.6866411	-.6196389
	15 mmol/L	-.2583000 [*]	.01623193	.000	-.2918011	-.2247989
5 mmol/L	0 mmol/L	.3540400 [*]	.01623193	.000	.3205389	.3875411
	7.5 mmol/L	-.1777600 [*]	.01623193	.000	-.2112611	-.1442589
	10 mmol/L	-.7761600 [*]	.01623193	.000	-.8096611	-.7426589
	12.5 mmol/L	-.2991000 [*]	.01623193	.000	-.3326011	-.2655989
	15 mmol/L	.0957400 [*]	.01623193	.000	.0622389	.1292411
7.5 mmol/L	0 mmol/L	.5318000 [*]	.01623193	.000	.4982989	.5653011
	5 mmol/L	.1777600 [*]	.01623193	.000	.1442589	.2112611
	10 mmol/L	-.5984000 [*]	.01623193	.000	-.6319011	-.5648989
	12.5 mmol/L	-.1213400 [*]	.01623193	.000	-.1548411	-.0878389
	15 mmol/L	.2735000 [*]	.01623193	.000	.2399989	.3070011
10 mmol/L	0 mmol/L	1.1302000 [*]	.01623193	.000	1.0966989	1.1637011
	5 mmol/L	.7761600 [*]	.01623193	.000	.7426589	.8096611
	7.5 mmol/L	.5984000 [*]	.01623193	.000	.5648989	.6319011
	12.5 mmol/L	.4770600 [*]	.01623193	.000	.4435589	.5105611
	15 mmol/L	.8719000 [*]	.01623193	.000	.8383989	.9054011
12.5 mmol/L	0 mmol/L	.6531400 [*]	.01623193	.000	.6196389	.6866411
	5 mmol/L	.2991000 [*]	.01623193	.000	.2655989	.3326011
	7.5 mmol/L	.1213400 [*]	.01623193	.000	.0878389	.1548411
	10 mmol/L	-.4770600 [*]	.01623193	.000	-.5105611	-.4435589
	15 mmol/L	.3948400 [*]	.01623193	.000	.3613389	.4283411
15 mmol/L	0 mmol/L	.2583000 [*]	.01623193	.000	.2247989	.2918011
	5 mmol/L	-.0957400 [*]	.01623193	.000	-.1292411	-.0622389
	7.5 mmol/L	-.2735000 [*]	.01623193	.000	-.3070011	-.2399989
	10 mmol/L	-.8719000 [*]	.01623193	.000	-.9054011	-.8383989
	12.5 mmol/L	-.3948400 [*]	.01623193	.000	-.4283411	-.3613389

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .001.

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Dry Weight

Dependent Variable: Dry_Weight
LSD

Multiple Comparisons

(I) Konsentrasi	(J) Konsentrasi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval Lower Bound	Upper Bound
0 mmol/L	5 mmol/L	-.3526800 [*]	.01604204	.000	-.3857891	-.3195709
	7.5 mmol/L	-.5308400 [*]	.01604204	.000	-.5639491	-.4977309
	10 mmol/L	-1.1299800 [*]	.01604204	.000	-1.1630891	-1.0968709
	12.5 mmol/L	-.6520400 [*]	.01604204	.000	-.6851491	-.6189309
	15 mmol/L	-.2591000 [*]	.01604204	.000	-.2922091	-.2259909
5 mmol/L	0 mmol/L	.3526800 [*]	.01604204	.000	.3195709	.3857891
	7.5 mmol/L	-.1781600 [*]	.01604204	.000	-.2112691	-.1450509
	10 mmol/L	-.7773000 [*]	.01604204	.000	-.8104091	-.7441909
	12.5 mmol/L	-.2993600 [*]	.01604204	.000	-.3324691	-.2662509
	15 mmol/L	.0935800 [*]	.01604204	.000	.0604709	.1266891
7.5 mmol/L	0 mmol/L	.5308400 [*]	.01604204	.000	.4977309	.5639491
	5 mmol/L	.1781600 [*]	.01604204	.000	.1450509	.2112691
	10 mmol/L	-.5991400 [*]	.01604204	.000	-.6322491	-.5660309
	12.5 mmol/L	-.1212000 [*]	.01604204	.000	-.1543091	-.0880909
	15 mmol/L	.2717400 [*]	.01604204	.000	.2386309	.3048491
10 mmol/L	0 mmol/L	1.1299800 [*]	.01604204	.000	1.0968709	1.1630891
	5 mmol/L	.7773000 [*]	.01604204	.000	.7441909	.8104091
	7.5 mmol/L	.5991400 [*]	.01604204	.000	.5660309	.6322491
	12.5 mmol/L	.4779400 [*]	.01604204	.000	.4448309	.5110491
	15 mmol/L	.8708800 [*]	.01604204	.000	.8377709	.9039891
12.5 mmol/L	0 mmol/L	.6520400 [*]	.01604204	.000	.6189309	.6851491
	5 mmol/L	.2993600 [*]	.01604204	.000	.2662509	.3324691
	7.5 mmol/L	.1212000 [*]	.01604204	.000	.0880909	.1543091
	10 mmol/L	-.4779400 [*]	.01604204	.000	-.5110491	-.4448309
	15 mmol/L	.3929400 [*]	.01604204	.000	.3598309	.4260491
15 mmol/L	0 mmol/L	.2591000 [*]	.01604204	.000	.2259909	.2922091
	5 mmol/L	-.0935800 [*]	.01604204	.000	-.1266891	-.0604709
	7.5 mmol/L	-.2717400 [*]	.01604204	.000	-.3048491	-.2386309
	10 mmol/L	-.8708800 [*]	.01604204	.000	-.9039891	-.8377709
	12.5 mmol/L	-.3929400 [*]	.01604204	.000	-.4260491	-.3598309

Based on observed means.
The error term is Mean Square(Error) = .001.
*. The mean difference is significant at the .05 level.

Indeks Pertumbuhan

Dependent Variable: Indeks_Pertumbuhan
LSD

Multiple Comparisons

(I) Konsentrasi	(J) Konsentrasi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval Lower Bound	Upper Bound
0 mmol/L	5 mmol/L	-.3540400 [*]	.01623193	.000	-.3875411	-.3205389
	7.5 mmol/L	-.5318000 [*]	.01623193	.000	-.5653011	-.4982989
	10 mmol/L	-1.1302000 [*]	.01623193	.000	-1.1637011	-1.0966989
	12.5 mmol/L	-.6531400 [*]	.01623193	.000	-.6866411	-.6196389
	15 mmol/L	-.2583000 [*]	.01623193	.000	-.2918011	-.2247989
5 mmol/L	0 mmol/L	.3540400 [*]	.01623193	.000	.3205389	.3875411
	7.5 mmol/L	-.1777600 [*]	.01623193	.000	-.2112611	-.1442589
	10 mmol/L	-.7761600 [*]	.01623193	.000	-.8096611	-.7426589
	12.5 mmol/L	-.2991000 [*]	.01623193	.000	-.3326011	-.2655989
	15 mmol/L	.0957400 [*]	.01623193	.000	.0622389	.1292411
7.5 mmol/L	0 mmol/L	.5318000 [*]	.01623193	.000	.4982989	.5653011
	5 mmol/L	.1777600 [*]	.01623193	.000	.1442589	.2112611
	10 mmol/L	-.6984000 [*]	.01623193	.000	-.7319011	-.6648989
	12.5 mmol/L	-.1213400 [*]	.01623193	.000	-.1548411	-.0878389
	15 mmol/L	.2735000 [*]	.01623193	.000	.2399989	.3070011
10 mmol/L	0 mmol/L	1.1302000 [*]	.01623193	.000	1.0966989	1.1637011
	5 mmol/L	.7761600 [*]	.01623193	.000	.7426589	.8096611
	7.5 mmol/L	.5984000 [*]	.01623193	.000	.5648989	.6319011
	12.5 mmol/L	.4770600 [*]	.01623193	.000	.4435589	.5105611
	15 mmol/L	.8719000 [*]	.01623193	.000	.8383989	.9054011
12.5 mmol/L	0 mmol/L	.6531400 [*]	.01623193	.000	.6196389	.6866411
	5 mmol/L	.2991000 [*]	.01623193	.000	.2655989	.3326011
	7.5 mmol/L	.1213400 [*]	.01623193	.000	.0878389	.1548411
	10 mmol/L	-.4770600 [*]	.01623193	.000	-.5105611	-.4435589
	15 mmol/L	.3948400 [*]	.01623193	.000	.3613389	.4283411
15 mmol/L	0 mmol/L	.2583000 [*]	.01623193	.000	.2247989	.2918011
	5 mmol/L	-.0957400 [*]	.01623193	.000	-.1292411	-.0622389
	7.5 mmol/L	-.2735000 [*]	.01623193	.000	-.3070011	-.2399989
	10 mmol/L	-.8719000 [*]	.01623193	.000	-.9054011	-.8383989
	12.5 mmol/L	-.3948400 [*]	.01623193	.000	-.4283411	-.3613389

Based on observed means.
The error term is Mean Square(Error) = .001.
*. The mean difference is significant at the .05 level.

■ SCV

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Settled_Cell_Volume
LSD

(I) Konsentrasi	(J) Konsentrasi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
0 mmol/L	5 mmol/L	-2.000000*	.09476288	.000	-2.1955809	-1.8044191
	7.5 mmol/L	-3.000000*	.09476288	.000	-3.1955809	-2.8044191
	10 mmol/L	-6.332000*	.09476288	.000	-6.5275809	-6.1364191
	12.5 mmol/L	-3.662000*	.09476288	.000	-3.8575809	-3.4664191
	15 mmol/L	-1.464000*	.09476288	.000	-1.6595809	-1.2684191
5 mmol/L	0 mmol/L	2.000000*	.09476288	.000	1.8044191	2.1955809
	7.5 mmol/L	-1.000000*	.09476288	.000	-1.1955809	-.8044191
	10 mmol/L	-4.332000*	.09476288	.000	-4.5275809	-4.1364191
	12.5 mmol/L	-1.662000*	.09476288	.000	-1.8575809	-1.4664191
	15 mmol/L	.536000*	.09476288	.000	.3404191	.7315809
7.5 mmol/L	0 mmol/L	3.000000*	.09476288	.000	2.8044191	3.1955809
	5 mmol/L	1.000000*	.09476288	.000	.8044191	1.1955809
	10 mmol/L	-3.332000*	.09476288	.000	-3.5275809	-3.1364191
	12.5 mmol/L	-.662000*	.09476288	.000	-.8575809	-.4664191
	15 mmol/L	1.536000*	.09476288	.000	1.3404191	1.7315809
10 mmol/L	0 mmol/L	6.332000*	.09476288	.000	6.1364191	6.5275809
	5 mmol/L	4.332000*	.09476288	.000	4.1364191	4.5275809
	7.5 mmol/L	3.332000*	.09476288	.000	3.1364191	3.5275809
	12.5 mmol/L	2.670000*	.09476288	.000	2.4744191	2.8655809
	15 mmol/L	4.868000*	.09476288	.000	4.6724191	5.0635809
12.5 mmol/L	0 mmol/L	3.662000*	.09476288	.000	3.4664191	3.8575809
	5 mmol/L	1.662000*	.09476288	.000	1.4664191	1.8575809
	7.5 mmol/L	.662000*	.09476288	.000	.4664191	.8575809
	10 mmol/L	-2.670000*	.09476288	.000	-2.8655809	-2.4744191
	15 mmol/L	2.198000*	.09476288	.000	2.0024191	2.3935809
15 mmol/L	0 mmol/L	1.464000*	.09476288	.000	1.2684191	1.6595809
	5 mmol/L	-.536000*	.09476288	.000	-.7315809	-.3404191
	7.5 mmol/L	-1.536000*	.09476288	.000	-1.7315809	-1.3404191
	10 mmol/L	-4.868000*	.09476288	.000	-5.0635809	-4.6724191
	12.5 mmol/L	-2.198000*	.09476288	.000	-2.3935809	-2.0024191

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .022.

*, The mean difference is significant at the .05 level.



Lampiran 7. Analisis Ragam untuk Konsentrasi Prekursor Sistein

■ Fresh Weight

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Fresh_Weight

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	6.830 ^a	5	1.366	3542.489	.000
Intercept	127.560	1	127.560	330805.325	.000
Konsentrasi	6.830	5	1.366	3542.489	.000
Error	.009	24	.000		
Total	134.399	30			
Corrected Total	6.839	29			

a. R Squared = ,999 (Adjusted R Squared = ,998)

■ Dry Weight

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Dry_Weight

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	6.839 ^a	5	1.368	3787.189	.000
Intercept	36.738	1	36.738	101714.051	.000
Konsentrasi	6.839	5	1.368	3787.189	.000
Error	.009	24	.000		
Total	43.586	30			
Corrected Total	6.848	29			

a. R Squared = ,999 (Adjusted R Squared = ,998)

■ Indeks Pertumbuhan

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Indeks_Pertumbuhan

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	6.830 ^a	5	1.366	3542.489	.000
Intercept	33.838	1	33.838	87752.348	.000
Konsentrasi	6.830	5	1.366	3542.489	.000
Error	.009	24	.000		
Total	40.677	30			
Corrected Total	6.839	29			

a. R Squared = ,999 (Adjusted R Squared = ,998)

■ SCV

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Settled_Cell_Volume

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	212.556 ^a	5	42.511	3825.247	.000
Intercept	3959.684	1	3959.684	356300.287	.000
Konsentrasi	212.556	5	42.511	3825.247	.000
Error	.267	24	.011		
Total	4172.507	30			
Corrected Total	212.823	29			

a. R Squared = .999 (Adjusted R Squared = .998)

7.1 Uji lanjut LSD prekursor sistein

■ Fresh Weight

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Fresh_Weight
LSD

(I) Konsentrasi	(J) Konsentrasi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
0 mmol/L	5 mmol/L	-.2524200*	.01241940	.000	-.2780524	-.2267876
	7.5 mmol/L	-.4813000*	.01241940	.000	-.5069324	-.4556676
	10 mmol/L	-1.4890400*	.01241940	.000	-1.5146724	-1.4634076
	12.5 mmol/L	-.5958000*	.01241940	.000	-.6214324	-.5701676
	15 mmol/L	-.2401000*	.01241940	.000	-.2657324	-.2144676
5 mmol/L	0 mmol/L	.2524200*	.01241940	.000	.2267876	.2780524
	7.5 mmol/L	-.2288800*	.01241940	.000	-.2545124	-.2032476
	10 mmol/L	-1.2366200*	.01241940	.000	-1.2622524	-1.2109876
	12.5 mmol/L	-.3433800*	.01241940	.000	-.3690124	-.3177476
	15 mmol/L	.0123200	.01241940	.331	-.0133124	.0379524
7.5 mmol/L	0 mmol/L	.4813000*	.01241940	.000	.4556676	.5069324
	5 mmol/L	.2288800*	.01241940	.000	.2032476	.2545124
	10 mmol/L	-1.0077400*	.01241940	.000	-1.0333724	-.9821076
	12.5 mmol/L	-.1145000*	.01241940	.000	-.1401324	-.0888676
	15 mmol/L	.2412000*	.01241940	.000	.2155676	.2668324
10 mmol/L	0 mmol/L	1.4890400*	.01241940	.000	1.4634076	1.5146724
	5 mmol/L	1.2366200*	.01241940	.000	1.2109876	1.2622524
	7.5 mmol/L	1.0077400*	.01241940	.000	.9821076	1.0333724
	12.5 mmol/L	.8932400*	.01241940	.000	.8676076	.9188724
	15 mmol/L	1.2489400*	.01241940	.000	1.2233076	1.2745724
12.5 mmol/L	0 mmol/L	.5958000*	.01241940	.000	.5701676	.6214324
	5 mmol/L	.3433800*	.01241940	.000	.3177476	.3690124
	7.5 mmol/L	.1145000*	.01241940	.000	.0888676	.1401324
	10 mmol/L	-.8932400*	.01241940	.000	-.9188724	-.8676076
	15 mmol/L	.3557000*	.01241940	.000	.3300676	.3813324
15 mmol/L	0 mmol/L	.2401000*	.01241940	.000	.2144676	.2657324
	5 mmol/L	-.0123200	.01241940	.331	-.0379524	.0133124
	7.5 mmol/L	-.2412000*	.01241940	.000	-.2668324	-.2155676
	10 mmol/L	-1.2489400*	.01241940	.000	-1.2745724	-1.2233076
	12.5 mmol/L	-.3557000*	.01241940	.000	-.3813324	-.3300676

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .000.

*. The mean difference is significant at the .05 level.

■ Dry Weight

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Dry_Weight
LSD

(I) Konsentrasi	(J) Konsentrasi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
0 mmol/L	5 mmol/L	-.2500400*	.01201980	.000	-.2748477	-.2252323
	7.5 mmol/L	-.4809800*	.01201980	.000	-.5057877	-.4561723
	10 mmol/L	-.14890600*	.01201980	.000	-.15138677	-.14642523
	12.5 mmol/L	-.5982200*	.01201980	.000	-.6230277	-.5734123
	15 mmol/L	-.2397600*	.01201980	.000	-.2645677	-.2149523
5 mmol/L	0 mmol/L	.2500400*	.01201980	.000	.2252323	.2748477
	7.5 mmol/L	-.2309400*	.01201980	.000	-.2557477	-.2061323
	10 mmol/L	-.12390200*	.01201980	.000	-.12638277	-.12142123
	12.5 mmol/L	-.3481800*	.01201980	.000	-.3729877	-.3233723
	15 mmol/L	.0102800	.01201980	.401	-.0145277	.0350877
7.5 mmol/L	0 mmol/L	.4809800*	.01201980	.000	.4561723	.5057877
	5 mmol/L	.2309400*	.01201980	.000	.2061323	.2557477
	10 mmol/L	-.10080800*	.01201980	.000	-.10328877	-.9832723
	12.5 mmol/L	-.1172400*	.01201980	.000	-.1420477	-.0924323
	15 mmol/L	.2412200*	.01201980	.000	.2164123	.2660277
10 mmol/L	0 mmol/L	1.4890600*	.01201980	.000	1.4642523	1.5138677
	5 mmol/L	1.2390200*	.01201980	.000	1.2142123	1.2638277
	7.5 mmol/L	1.0080800*	.01201980	.000	.9832723	1.0328877
	12.5 mmol/L	.8908400*	.01201980	.000	.8660323	.9156477
	15 mmol/L	1.2493000*	.01201980	.000	1.2244923	1.2741077
12.5 mmol/L	0 mmol/L	.5982200*	.01201980	.000	.5734123	.6230277
	5 mmol/L	.3481800*	.01201980	.000	.3233723	.3729877
	7.5 mmol/L	.1172400*	.01201980	.000	.0924323	.1420477
	10 mmol/L	-.8908400*	.01201980	.000	-.9156477	-.8660323
	15 mmol/L	.3584600*	.01201980	.000	.3336523	.3832677
15 mmol/L	0 mmol/L	.2397600*	.01201980	.000	.2149523	.2645677
	5 mmol/L	-.0102800	.01201980	.401	-.0350877	.0145277
	7.5 mmol/L	-.2412200*	.01201980	.000	-.2660277	-.2164123
	10 mmol/L	-1.2493000*	.01201980	.000	-1.2741077	-1.2244923
	12.5 mmol/L	-.3584600*	.01201980	.000	-.3832677	-.3336523

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .000.

*. The mean difference is significant at the .05 level.



■ Indeks Pertumbuhan

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Indeks_Pertumbuhan
LSD

(I) Konsentrasi	(J) Konsentrasi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
0 mmol/L	5 mmol/L	-.2524200*	.01241940	.000	-.2780524	-.2267876
	7.5 mmol/L	-.4813000*	.01241940	.000	-.5069324	-.4556676
	10 mmol/L	-.14890400*	.01241940	.000	-.15146724	-.14634076
	12.5 mmol/L	-.6958000*	.01241940	.000	-.6214324	-.5701676
	15 mmol/L	-.2401000*	.01241940	.000	-.2657324	-.2144676
5 mmol/L	0 mmol/L	.2524200*	.01241940	.000	.2267876	.2780524
	7.5 mmol/L	-.2288800*	.01241940	.000	-.2545124	-.2032476
	10 mmol/L	-.12366200*	.01241940	.000	-.12622524	-.12109876
	12.5 mmol/L	-.3433800*	.01241940	.000	-.3690124	-.3177476
	15 mmol/L	.0123200	.01241940	.331	-.0133124	.0379524
7.5 mmol/L	0 mmol/L	.4813000*	.01241940	.000	.4556676	.5069324
	5 mmol/L	.2288800*	.01241940	.000	.2032476	.2545124
	10 mmol/L	-1.0077400*	.01241940	.000	-1.0333724	-.9821076
	12.5 mmol/L	-.1145000*	.01241940	.000	-.1401324	-.0888676
	15 mmol/L	.2412000*	.01241940	.000	.2155676	.2668324
10 mmol/L	0 mmol/L	1.4890400*	.01241940	.000	1.4634076	1.5146724
	5 mmol/L	1.2366200*	.01241940	.000	1.2109876	1.2622524
	7.5 mmol/L	1.0077400*	.01241940	.000	.9821076	1.0333724
	12.5 mmol/L	.8932400*	.01241940	.000	.8676076	.9188724
	15 mmol/L	1.2489400*	.01241940	.000	1.2233076	1.2745724
12.5 mmol/L	0 mmol/L	.5958000*	.01241940	.000	.5701676	.6214324
	5 mmol/L	.3433800*	.01241940	.000	.3177476	.3690124
	7.5 mmol/L	.1145000*	.01241940	.000	.0888676	.1401324
	10 mmol/L	-.8932400*	.01241940	.000	-.9188724	-.8676076
	15 mmol/L	.3557000*	.01241940	.000	.3300676	.3813324
15 mmol/L	0 mmol/L	.2401000*	.01241940	.000	.2144676	.2657324
	5 mmol/L	-.0123200	.01241940	.331	-.0379524	.0133124
	7.5 mmol/L	-.2412000*	.01241940	.000	-.2668324	-.2155676
	10 mmol/L	-1.2489400*	.01241940	.000	-1.2745724	-1.2233076
	12.5 mmol/L	-.3557000*	.01241940	.000	-.3813324	-.3300676

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .000.

*. The mean difference is significant at the .05 level.

■ SCV

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Settled_Cell_Volume
LSD

(I) Konsentrasi	(J) Konsentrasi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
0 mmol/L	5 mmol/L	-1.4640000 [*]	.06667333	.000	-1.6016070	-1.3263930
	7.5 mmol/L	-2.7280000 [*]	.06667333	.000	-2.8656070	-2.5903930
	10 mmol/L	-8.3320000 [*]	.06667333	.000	-8.4696070	-8.1943930
	12.5 mmol/L	-3.3980000 [*]	.06667333	.000	-3.5356070	-3.2603930
	15 mmol/L	-1.3980000 [*]	.06667333	.000	-1.5356070	-1.2603930
5 mmol/L	0 mmol/L	1.4640000 [*]	.06667333	.000	1.3263930	1.6016070
	7.5 mmol/L	-1.2640000 [*]	.06667333	.000	-1.4016070	-1.1263930
	10 mmol/L	-6.8680000 [*]	.06667333	.000	-7.0056070	-6.7303930
	12.5 mmol/L	-1.9340000 [*]	.06667333	.000	-2.0716070	-1.7963930
	15 mmol/L	.0660000	.06667333	.332	-.0716070	.2036070
7.5 mmol/L	0 mmol/L	2.7280000 [*]	.06667333	.000	2.5903930	2.8656070
	5 mmol/L	1.2640000 [*]	.06667333	.000	1.1263930	1.4016070
	10 mmol/L	-5.8040000 [*]	.06667333	.000	-5.7416070	-5.4663930
	12.5 mmol/L	-.6700000 [*]	.06667333	.000	-.8076070	-.5323930
	15 mmol/L	1.3300000 [*]	.06667333	.000	1.1923930	1.4676070
10 mmol/L	0 mmol/L	8.3320000 [*]	.06667333	.000	8.1943930	8.4696070
	5 mmol/L	6.8680000 [*]	.06667333	.000	6.7303930	7.0056070
	7.5 mmol/L	5.6040000 [*]	.06667333	.000	5.4663930	5.7416070
	12.5 mmol/L	4.9340000 [*]	.06667333	.000	4.7963930	5.0716070
	15 mmol/L	6.9340000 [*]	.06667333	.000	6.7963930	7.0716070
12.5 mmol/L	0 mmol/L	3.3980000 [*]	.06667333	.000	3.2603930	3.5356070
	5 mmol/L	1.9340000 [*]	.06667333	.000	1.7963930	2.0716070
	7.5 mmol/L	.6700000 [*]	.06667333	.000	.5323930	.8076070
	10 mmol/L	-4.9340000 [*]	.06667333	.000	-5.0716070	-4.7963930
	15 mmol/L	2.0000000 [*]	.06667333	.000	1.8623930	2.1376070
15 mmol/L	0 mmol/L	1.3980000 [*]	.06667333	.000	1.2603930	1.5356070
	5 mmol/L	-.0660000	.06667333	.332	-.2036070	.0716070
	7.5 mmol/L	-1.3300000 [*]	.06667333	.000	-1.4676070	-1.1923930
	10 mmol/L	-6.9340000 [*]	.06667333	.000	-7.0716070	-6.7963930
	12.5 mmol/L	-2.0000000 [*]	.06667333	.000	-2.1376070	-1.8623930

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .011.

*. The mean difference is significant at the .05 level.

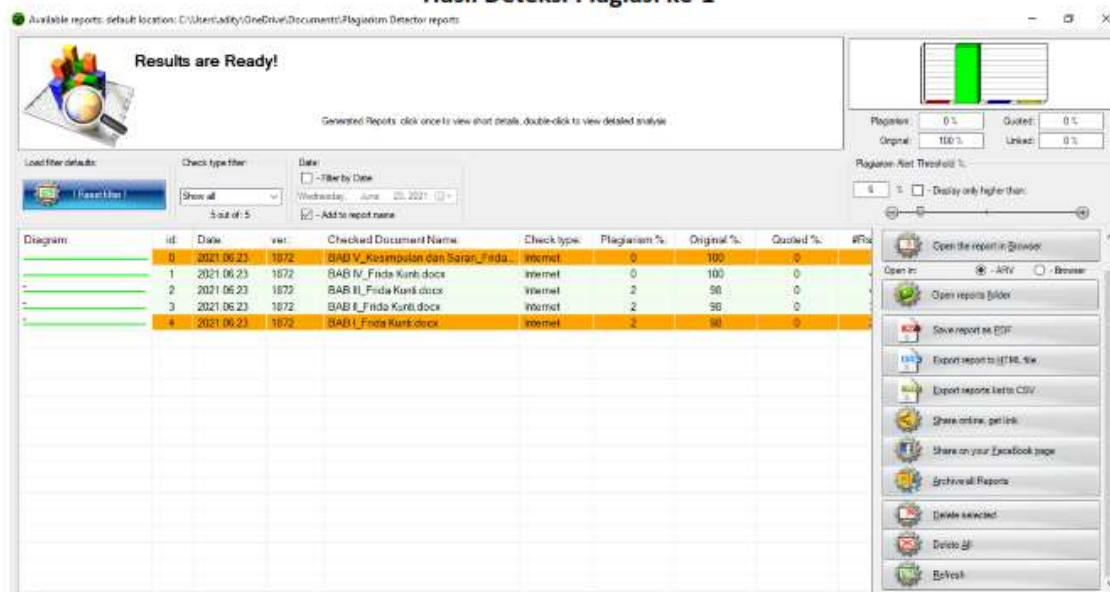


Lampiran 8. Surat Keterangan Bebas Plagiasi

Laporan Hasil Deteksi Plagiasi

Nama : Frida Kunti Setiowati
 Jenis Artikel : Disertasi
 Program Studi : Program Doktor Biologi

Hasil Deteksi Plagiasi ke-1



Lampiran 9. Bukti diterima (LoA) pada *Proceedings of IOP Conference Series : Earth and Environmental Science*



INTERNATIONAL CONFERENCE ON
GLOBAL
RESOURCE
CONSERVATION

The 10th International Conference on Global Resource Conservation
(ICGRC)

September 4-5th, 2019

Secretary: Biology Dept., Faculty of Mathematics & Natural Science, Universitas Brawijaya, Jl. Veteran Malang, East Java, Indonesia 65145
Phone/Fax: +62-341576681 | Website: <http://icgrc-ub.ac.id> | Email: icgrc@icgrc-ub.ac.id

Our Ref: 063/XI/ICGRC/2019

Malang, 15 Nov 2019

Subject: **Notification of Manuscript Acceptance**

Dear Dr./Mr./Mrs. Frida Kunti Setiowati,

It is my pleasure to inform you that the manuscript entitled:

"Comparison of Organosulfur Bioactive Compounds in Bulb, Callus and Cells Suspension of Single Garlic (*Allium sativum*. L)"

has been accepted for online publication in the **Proceedings of IOP Conference Series: Earth and Environmental Science** on April 2020.

I would like to thank you for submitting your excellent work to the proceedings.

Yours sincerely,
On behalf of IOP EES Chief Editor



Dr. Irfan Mustafa
ICGRC Proceedings Chief Editor
Biology Department
Universitas Brawijaya

Lampiran 10. Bukti diterima (LoA) pada JJBS (*Jordan Journal of Biological Science*)

Jordan Journal of Biological Sciences (JJBS)

ISSN 1995- 6673 (Print), 2307- 7166 (Online)

<http://jjbs.hu.edu.jo>

Dear Dr. Frida Kunti

June 5, 2021

Manuscript Title: Enhanced Production of Organosulfur Bioactive Compounds In Cell Suspension Culture of Single Garlic (*Allium sativum* L.) Using Precursor Feeding

Frida K Setiowati^{1,3,*}, Wahyu Widoretno¹, Sasangka Prasetyawan² and Betty Lukiat³

¹Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Universitas Brawijaya, Malang 65145, East Java, Indonesia, ²Department of Chemistry, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Universitas Brawijaya, Malang 65145, East Java, Indonesia, ³Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Universitas Negeri Malang, Malang 65145, East Java, Indonesia

*Corresponding author e-mail: frida.fmipa@um.ac.id

Received: December 29, 2020; Revised: April 20, 2021; Accepted: June 5, 2021

Thank you for submitting the above mentioned manuscript to Jordan Journal of Biological Sciences (JJBS). I am pleased to tell you that your paper has been accepted for publication. Your Manuscript will be published in Volume 15, issue 2 (June), 2022.



Lampiran 11. Bukti diterima (LoA) pada jurnal Farmacia



